

1

2

3

4

5 魚類の光受容能の解析と単色光照射による
6 生理学的な変化に関する研究

7

8 Analysis of the photoreceptive and physiological changes in fish
9 by irradiation of specific light wavelength

10

11

12

13

14

15

16

17

鹿児島大学大学院連合農学研究科

18

農水圏資源環境科学専攻

19

早坂央希

20

21

2021

22

目次

23	
24	
25	略語一覧・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ V
26	第1章 総合緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
27	
28	＜魚類養殖における性＞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 1
29	＜環境要因による性分化・性転換＞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4
30	＜光が魚類の生理状態に与える影響＞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 7
31	＜本研究の目的＞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9
32	
33	第2章 網膜電図記録によるメダカの視感度と閾値の解析
34	1) 背景・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 10
35	2) 材料と方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 13
36	2)-1 実験動物と倫理
37	2)-2 網膜組織の観察
38	2)-3 網膜からの視細胞の単離
39	2)-4 網膜電図(ERG)の記録システム
40	2)-5 暗条件と明条件下での ERG 記録の工程

41	2)-6 閾値決定方法	
42	2)-7 暗所および明所下での視感度の推定	
43	3) 結果	21
44	3)-1 網膜運動反応と視細胞外節の長さについて	
45	3)-2 刺激時間間隔の決定と信号記録からのノイズ除去について	
46	3)-3 b波のピークタイムの差と光刺激強度(PFD)、相互相関関数と光刺激強度	
47	(PFD)の関係について	
48	3)-4 メダカの分光視感度と絶対閾値について	
49	4) 考察	35
50		
51	第3章 特定の光波長照射によるメダカ生殖腺への影響評価	
52	1) 背景	40
53	2) 材料と方法	43
54	2)-1 実験動物と倫理	
55	2)-2 飼育環境	
56	2)-3 稚魚期のメダカのオペシン遺伝子発現について	
57	2)-4 遺伝的な性判別法	
58	2)-5 表現型の性判別法	

59	2)-6	性転換個体の精子の性状評価と人工授精による交配試験による	
60		F1世代の性判定	
61	2)-7	生殖細胞数の測定と性転換時期の推定	
62	2)-8	緑色光下での生残率の推定	
63	2)-9	性分化期の個体を用いたコルチゾルアッセイ	
64	2)-10	統計処理	
65	3)	結果	50
66	3)-1	オプシン遺伝子の発現について	
67	3)-2	遺伝的な性と表現型の性の不一致率	
68	3)-3	遺伝的な性と表現型の性が不一致となった個体の配偶子の機能試験	
69	3)-4	生殖細胞に基づく性転換時期の推定	
70	3)-5	生残率とコルチゾル濃度について	
71	4)	考察	66
72			
73		第4章 特定の光波長照射による水産有用魚種を用いた性転換誘導試験	
74	1)	背景	71
75	2)	材料と方法	73
76	2)-1	供試魚	

77	2)-2 飼育条件	
78	2)-3 性判別マーカー	
79	2)-4 生殖腺組織切片	
80	2)-5 ゲノム PCR	
81	3) 結果	80
82	3)-1 性マーカーの一致	
83	3)-2 遺伝的な性と表現型の性の不一致率	
84	4) 考察	85
85		
86	第5章 総合考察	88
87		
88	謝辞	93
89		
90	参考文献	95
91		
92		
93		
94		
95		
96		
97		
98		

略語一覧

- 99
100
101
102 11-KT : 11-Ketotestosterone
103 ABR : Auditory Brain-stem Response
104 ACTH : Adrenocorticotropic Hormone
105 *amhr2* : Anti-Müllerian hormone receptor 2
106 *amhy* : Anti-Müllerian hormone receptor y
107 *amhΔY* : Anti-Müllerian hormone receptorΔY
108 cDNA : Complementary DNA
109 *crhr1* : Corticotropin-releasing hormone receptor 1
110 *crhr2* : Corticotropin-releasing hormone receptor 2
111 *cyp19a1a* : cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1a
112 *dmrt1* : Double sex and mab3 related transcription factor 1
113 *dmy* : DM-domain gene on the Y chromosome
114 DO : Dissolved oxygen
115 dph : Day after hatch
116 DW : Distilled water
117 *ef1* : Elongation factor 1-alpha
118 ERG : Electroretinogram
119 E2 : エストラジオール
120 Fd : Fadrozole
121 FWHM : full width at half maximum
122 GnRH : Gonadotropin releasing hormone
123 *gsdf* : Gonadal soma derived factor

- 124 H&E : Hematoxylin Eosin
- 125 *Irf9* : Interferon regulatory factor 9
- 126 LED : Light emitting diode
- 127 LWS : Long wavelength-sensitive opsin
- 128 *mch1* : Melanin-concentrating hormone receptor 1
- 129 *mch2* : Melanin-concentrating hormone receptor 2
- 130 MS222 : Tricaine methanesulfonate
- 131 MSP : Microspectrophotometry
- 132 MT : Methyltestosterone
- 133 ND フィルター : neutral density フィルター
- 134 *npy* : Neuropeptide Y
- 135 *orx* : Orexin
- 136 *pacap* : Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide
- 137 *pax6* : Paired box protein Pax-6
- 138 PBS : Phosphate-buffered saline
- 139 PCR : Polymerase chain reaction
- 140 PFD : Photon flux density
- 141 pH : Potential hydrogen
- 142 *pomc-c* : Pro-opiomelanocortin c
- 143 *ppara*: peroxisome proliferator-activated receptor α
- 144 RH1 : Rhodopsin 1
- 145 RH2 : Rhodopsin 2
- 146 RNA : Ribonucleic acid
- 147 RT-PCR : Reverse transcription PCR

- 148 SWS1 : Short wavelength sensitive type 1 opsin
- 149 SWS2 : Short wavelength sensitive type 2 opsin
- 150 TMT opsin : Teleost multiple tissue opsin
- 151 UV : Ultraviolet
- 152 VAL-opsin : Vertebrate ancient-long opsin
- 153 VA-opsin : Vertebrate ancient opsin
- 154
- 155
- 156
- 157
- 158
- 159
- 160
- 161

第1章 総合緒言

162

163 近年、世界規模で養殖生産量は増加している¹。養殖生産量の拡大に伴って、効率の良い
164 養殖が求められると考えられる。効率の良い養殖とは、養殖魚における経済形質の向上であ
165 る。本研究では、経済形質のひとつである魚類の性に着目し、魚類の性を人為的に制御する
166 ことで効率の良い養殖技術の開発を目指す。

167

168

169 <魚類養殖における性>

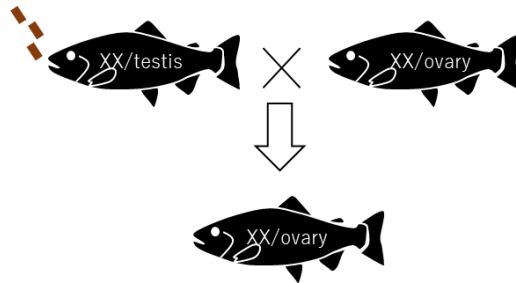
170 魚類では、成長速度や肉質、生殖腺など形態的、生理学的な性差が存在するため、これら
171 を人為的に制御できれば養殖魚の市場価値を高められる。例えば、トラフグ (*Takifugu*
172 *rubripes*) ではオスの精巣に市場価値がありオスが好まれる²。一方、チョウザメ
173 (*Acipenseridae*) では魚卵に市場価値があるためメスが好まれる^{3,4}。また、いくつかの魚種
174 では、性によって成長速度が異なることに起因した、雌雄間の市場価値の違いがある。ヒラ
175 メ (*Paralichthys olivaceus*) では、オスに比べてメスの成長速度が早いためメスが好まれ
176 ⁵、ティラピア (*Oreochromis niloticus*) では、メスに比べてオスの成長速度が早いためオ
177 スが好まれる⁶。したがって、養殖業において性統御は重要な技術であると言える。性統御
178 を行う上で単一の性の個体のみを生産することが出来れば、魚類養殖において効率の良い
179 生産が可能となる。単一の性の個体のみを生産するためには、性ホルモン投与による性転換

180 誘導を介した性統御手法が用いられている⁷。性ホルモンを生殖腺が未分化な時期に投与す
181 ることで、性転換を誘導し全メス集団や全オス集団を作出することは可能であるが、性ホル
182 モンや薬剤処理を行った養殖魚を食品とすることは、食品の安全性の観点から望ましくな
183 い⁸。そのため F1 世代や F3 世代を用いた全メス、全オス種苗生産を行う必要がある。具体
184 的には、XX/XY 型の生殖様式をとる魚類の場合、性が未分化な時期の遺伝的なメス (XX)
185 個体に、雄性ホルモンであるメチルテストステロン (MT) や 11-ケトテストステロン (11-
186 KT) を投与することで遺伝的なメスでありながら精巣を有する偽オスを作出できる⁹。この偽
187 オスと正常なメスを交配させることで次世代を全メス集団にすることができる (Fig.1. 1a)。
188 また、全オス集団を作出する場合、性が未分化な状態の遺伝的なオス (XY) にアロマーゼ
189 阻害剤であるファドロゾール (Fd) を投与し、遺伝的なオスで卵巣を有する個体を作成し、
190 この個体と正常なオスを交配させることで、次世代に YY 染色体を有する超オスが出現す
191 る。この超オスと正常なメスを交配することで次世代が全オス集団となる (Fig. 1. 1b)。し
192 かし、性ホルモンはヒトに対しても生理活性を有するため投薬技術が求められることや、性
193 ホルモンの過剰投与は配偶子の質の低下をまねく。したがって、魚類養殖で性統御を行うた
194 めには、より性ホルモンを使用しない簡便な方法が必要であると考えられる。

195

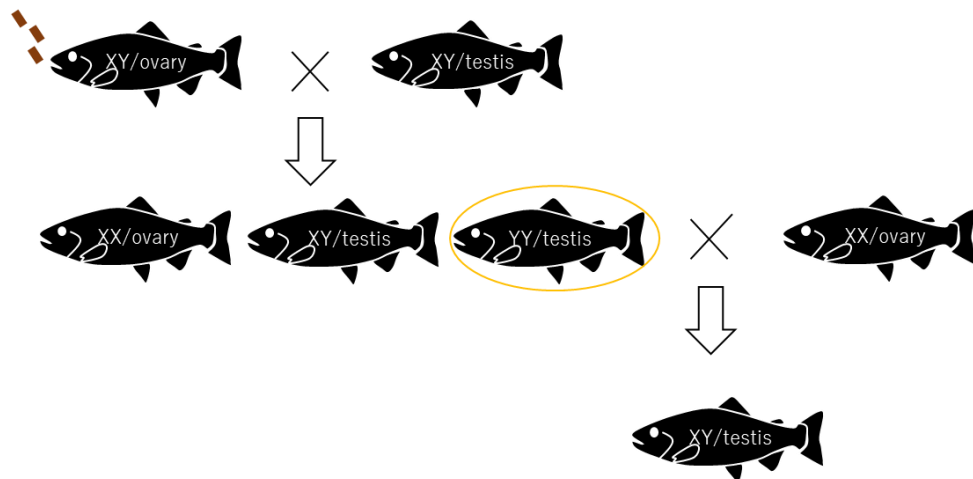
(a)

Administration of sex hormone
(Methyltestosterone)



(b)

Administration of sex hormone
(Fadrozole)



196

197 Fig.1. 1

198 All female or all male production method.

199 (a) The neo-male (XX/testis) was produced by administration of sex hormone. F1

200 generation shows all female groups. (b) The XY/ovary individual was produced by

201 administration of sex hormone which make super male (YY/testis) by cross breeding.

202 Next generation shows all male groups.

203

204

205

206

207 <環境要因による性分化、性転換>

208 一般に魚類の性分化は、以下のような過程を辿る。生殖腺体細胞は、側板中胚葉に由来し、
209 始原生殖細胞と生殖腺体細胞は、胚の生殖腺原基の領域に移動して背側の体腔上皮に沿っ
210 て生殖腺原基を形成するために、移動した生殖腺体細胞と始原生殖細胞が相互作用する。体
211 細胞由来であるセルトリ細胞は、精原細胞を囲み輸精管形成と精子形成を促進し、ステロイ
212 ド産生細胞であるライディッヒ細胞は輸精管周辺の間質領域に存在しアンドロゲンを生産
213 して精巣を形成する。一方では、顆粒膜細胞が卵母細胞を取り囲み卵濾胞を形成し、ステロ
214 イド産生細胞である莢膜細胞で生産されたアンドロゲンをアロマターゼによってエストロ
215 ゲン変換し卵巣を形成する^{10,11}。

216 いくつかの魚類では、マスター性決定遺伝子が同定されている。メダカでは、*dmrt1* のオ
217 ーソログである *dmy* が性決定遺伝子であり転写因子をコードしている^{12,13}。パタゴニアペ
218 ヘレイ (*Odontesthes bonariensis*) では、抗ミューラー管ホルモンをコードする *amhy*、トラ
219 フグ (*Takifugu rubripes*) でも抗ミューラー管ホルモン II 型受容体をコードする *amhr2*、ニジ
220 マス (*Oncorhynchus mykiss*) ではインターフェロン調節因子 9 (*Irf9*) の C 末端に相同性を示
221 す新規タンパク質をコードしている遺伝子が性決定遺伝子であることが報告されている¹⁴
222 ¹⁶。これらの性決定遺伝子を有する魚類でも性分化期の外部環境や性分化期に性ステロイド
223 ホルモンを投与することで性転換が誘導される。ナイルティラピアでは、アロマターゼ阻害
224 剤である (Fd) を 90 day post hatching (dph) の遺伝的メスに 60 日間投与することで、10%

225 程の割合で遺伝的メスでありながら機能的な精巣を有する個体が出現する¹⁷。さらに、魚類
226 の幹細胞が持つ分化能は柔軟であり、例えば、成魚のナイルティラピアに Fd を 6 か月投与
227 したところ、遺伝的メスから機能的な精巣を有するオスへ性転換が見られたことが報告さ
228 れている¹⁸。この例のように、成魚になっても機能的な性転換が誘導される場合がある。

229 一部の魚類では、環境要因の変化によって性転換が誘導される、または、性比が偏ること
230 が報告されている。これまでに水温、pH、溶存酸素 (DO)、密度等の環境要因が、性分化に
231 影響を与える報告がある^{11,19}。魚類では、トウゴロウイワシ目の *Menidia menidia* の異なる
232 水温下の飼育での性分化への影響が最初の報告である²⁰。水温が性分化、性転換に及ぼす影
233 響については多くの魚種で報告があり、ゼブラフィッシュ (*Danio Danio*)、メダカ、ティラ
234 ピアは高水温環境下ではオス化することが報告されている²¹⁻²³。また、トウゴロウイワシ
235 目の *Atherinopsidae* では、高水温下ではオス化するが、低水温ではメス化することが報告さ
236 れている²⁴。pH の変動による性分化への影響についての報告例は少なく、主にシクリット
237 科に属する種類でのみ報告があり、酸性になるとオスの比率が増加し、アルカリ性になると
238 メスの比率が増加する^{25,26}。DO についても、低酸素状態にすることでオスに性比が偏るこ
239 とが、ゼブラフィッシュやメダカで報告されている^{27,28}。密度が性分化に与える影響は、主
240 にウナギ目で報告されており、ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) やアメリカウナギ (*Anguilla*
241 *rostrata*) は飼育密度が高いとオスに性比が偏る²⁹。養殖現場でも多くの個体がオスである
242 ことから飼育密度が関係していることが予想される。これらの環境要因が魚類の性分化に

243 どのように機構で影響を及ぼすかについては未解明な部分が多い。現在、これらの環境要因
244 が魚類に与えるストレスが性分化（メスからオス）に影響を及ぼす仮説が提唱されている
245 ^{19,30}。ここでのストレスとは、環境刺激に対する内分泌反応を意味し、特にグルココルチコ
246 イドの分泌と合成を指摘している。外部環境からのストレスに応答して、副腎または、副腎
247 間質からグルココルチコイドが血中に放出される ³⁰。グルココルチコイドの一種であるコ
248 ルチゾルによるオス化を引き起こす経路について、コルチゾルの増加と共に魚類の主要な
249 アンドロゲンである 11-KT の上昇が見られたことが *Odontesthes Bonariensis* で報告されてい
250 る ³¹。ペヘレイは、性決定遺伝子を有し、かつ温度依存型性決定機構を有する ¹⁴。このペヘ
251 レイの性分化期の個体を用いて、温度の上昇（17°C、24°C、29°C）と共にコルチゾルの濃度
252 が増加し、さらに、コルチゾル濃度の増加に伴ってオスの比率が上昇する ³²。この現象を報
253 告した実験では、コルチゾル添加区、オス化試験区（29°C）ミックス試験区（24°C）、メス
254 化試験区（17°C）で飼育した孵化後 2 週間後の個体で 11-KT の濃度も測定したところ、コ
255 ルチゾル添加区とオス化試験区での 11-KT レベルに差はなく、メス化区で有意に低い濃度
256 を示している ³²。さらに、精巣培養による実験では 11-KT 合成酵素をコードする *hsd11b2* の
257 発現ならびに 11-KT の量がコルチゾルの濃度に依存して増加し、減少に転じる ³¹。一方、
258 コルチゾルがアンドロゲンからエストロゲンへ変換する酵素であるアロマターゼをコード
259 する *cyp19a1a* のプロモーター上でコルチゾル・グルココルチコイドレセプター複合体がグ
260 ルココルチコイド応答配列に結合することで *cyp19a1a* の発現を減少させ、結果としてオス

261 化を誘導することがヒラメで報告されている^{30,33}。

262

263

264 <光が魚類の生理状態に与える影響>

265 水中光環境は河川、沿岸、沖合、遠洋域等の生息水域の海水の光学的特性により地域や水

266 深で光の波長分布が大きく異なる。魚類はそれぞれの環境で効率的な視覚を獲得するため

267 に多様な視物質を発達させており、分子生物学レベルで多様な遺伝子の発現が解明されて

268 きている^{34,35}。そして、光は魚類の性成熟や成長を促す重要な環境要因であることが知られ

269 ている。

270 いくつかの過去の研究例では、光の中でも光波長に着目し、魚類の成長や成熟について報

271 告している。近年、異体類では緑色光を照射して飼育することで成長が良くなることが明ら

272 かとなった³⁶⁻³⁸。Yamanome et al.³⁶は、マツカワ (*Verasper moseri*) を青色光 (466 nm)、緑

273 (555 nm)、赤 (622 nm)、自然光下で 14 週間飼育したところ、緑色光下で成長の促進が見

274 られ、赤色光下で成長の抑制が見られたことを報告している。Takahashi et al.³⁷は、同じマ

275 ツカワを供試魚とし、異なる水温下 (14.9°C、8.6°C、6.6°C) で青色光 (464 nm)、緑 (518

276 nm)、赤 (635 nm)、自然光下で飼育を行ったところ、ここでも緑および青色光試験区で、

277 赤色光試験区に比べて高い成長率を示した。さらに、ヒラメでも同様に緑色光照射により高

278 成長が見られたことを報告している³⁸。この緑色光照射による成長メカニズムについて

279 は、メラニン凝集ホルモン（MCH）が着目されており、12°C、15°C、18°C、21°C のいずれ
280 の水温でも白色コントロール区に対して緑色光試験区で有意に高い *mch1* の発現が見られ、
281 *mch2* も 21°C 試験区では有意に高い発現を示した³⁸。他の *orx*、*npv*、*pacap*、*pomc-c* は、発
282 現の上昇が一部の試験区で見られたことより、これらの神経ペプチドホルモンが食欲と成
283 長に関与している可能性があり、特に *mch* がどの試験区でも高発現していたことから MCH
284 が強く関与している可能性を指摘している³⁸。

285 特定光波長照射と魚類の性についての研究は少なく Choi and Choi.³⁹ は、非視覚オプシ
286 ンであり緑色光感受性がある VAL オプシン（vertebrate ancient long opsin）が GnRH を介し
287 た性成熟に関与する可能性をキンギョ（*Carassius auratus*）を用いた実験で報告している。
288 しかし、特定の光波長が性分化に与える影響については報告がない。

289

290

291 <本研究の目的>

292 上述のように、魚類の性は柔軟であり、かつ性決定遺伝子を有しつつも性分化は外部要因
293 の影響を受けやすいことが予想される。そこで本研究では、環境要因の一つである光波長が
294 性分化にどのような影響を及ぼすか明らかにし、得られた知見を養殖業へ応用できる技術
295 か検討した。水生生物が強く依存する光とその受容体を通したシグナルが性分化へ及ぼす
296 影響については殆ど知見がなく、光環境を制御することで性分化を制御できればより簡易

297 な性統御技術の開発が期待できる。本研究では、メダカを供試魚として用いた。メダカは、
298 性決定遺伝子が同定されており、遺伝的な性と表現型の性を調べることができるため、これ
299 らの性が不一致となる個体が出現すれば、性転換個体を検出できる。また、飼育が容易で世
300 代が短いため、交配試験に適している。メダカは、各オプシン遺伝子が同定され極大分光吸
301 収波長が明らかになっている。しかし、各光波長に対する視感度及び、閾値等の基礎的な情
302 報が不足しており、光照射試験を行う際に、光波長と適切な光強度を選択する基準がない。
303 そこで、網膜電図法により明暗所における視感度と視覚閾値を計測した。この結果を元に、
304 照射する波長を選択し、メダカにとって十分に感知できる光強度を設定した。この飼育で使
305 用した魚体の遺伝的な性と表現型の性が不一致となるかどうかを確認することにより性転
306 換の有無を確認した。また、この性転換が機能的なものであるかどうかを確認するために、
307 性転換した個体から配偶子を採取し、通常の個体と人工授精を行い正常に発生するかどうか
308 か検討した。さらに、発生が進み成長した次世代の個体の性を判別した。また、当該現象の
309 応用性を確認するために、メダカで性転換が確認された条件を適用して養殖対象魚種への
310 応用を試みた。

311

312

313

314

315 第2章 網膜電図記録によるメダカの視感度と閾値の解析

316

317

背景

318

319 網膜電図 (ERG: electroretinogram) は、網膜内の多数の細胞から生成された一つの連続し
320 た電位を記録する手法である。この ERG 記録技術は、単一細胞記録に比べて非侵襲的で、
321 かつ実験が容易である。ERG は、様々な動物 (例えば、サル、ヒトおよびマウス) におい
322 て、視感度および時間分解能などの光刺激に対する視覚応答の特性を明らかにするために
323 使用される最も一般的な技術の一つである⁴⁰⁻⁴³。一般に、水棲動物における ERG 記録は、
324 ワイヤーまたはガラス電極を、角膜の表面に配置するか、眼球に穿刺するように用いられる
325 ⁴⁴⁻⁴⁶。記録された電気信号は、異なる細胞から生成された電位で構成される4つの波 (a-d
326 波) に分けられる。網膜に局在する細胞から出る電気信号を選択的にブロックする薬剤を用
327 いた研究によって、a 波は視細胞での過分極応答に由来し、b 波は脱分極した2次細胞 (双
328 極細胞および Müller 細胞) に由来する。c 波は、網膜色素上皮細胞に由来し、d 波は双極細
329 胞に由来することが示されている⁴⁷。a 波から d 波の振幅は刺激の持続時間、強度、網膜
330 の暗順応、明順応状態によって変化するが、b 波は正の方向に応答する一過性の反応として
331 最も目に見えるものである。したがって、この b 波の応答振幅は、刺激強度の幅や閾値レベ
332 ルを決定するために良く測定に用いられる。ERG 記録は、視覚の研究における標準的な技

333 術の一つとして使用されてきたが、簡易かつ迅速に閾値を決定するための分析方法はまだ
334 確立されていない。閾値は一般に、弱い光刺激から応答が飽和するまでの刺激強度を求め、
335 この応答強度と刺激強度との関係性に基づいて決定される。この関係性を $V/\log I$ 曲線とし
336 て求め、Naka-Rushton 関数⁴⁸ や、または別の類似した式に適用する⁴⁹。そして閾値は、指
337 標電圧に達する刺激強度として回帰式から得られる。この指標電圧は、電氣的ノイズが存在
338 する記録よりも上の値を実験者が決定して設定する。しかし、実験者が設定する指標電圧に
339 よって閾値強度が変化する可能性がある。本研究では、記録した波形を迅速かつ客観的に解
340 析する方法を一般的な計算プログラムで開発した。従来の方法では、刺激間隔を十分に確保
341 しながら、様々な波長や強度に対する応答を記録する必要があるため、実験時間が長くなり
342 がちであったが、新たに開発した方法では、従来の方法より短時間で記録が取れるため視覚
343 電気生理の分野で特に有用である。

344 本研究では、特定の光波長照射が性分化にどのような影響を及ぼすか明らかにするため
345 に、モデル魚であるメダカを用いて飼育試験を行う。そこで、典型的な光受容器官である網
346 膜に着目し、メダカにとって感度良い波長と光を感知できる光強度を設定する必要がある。
347 メダカはゼブラフィッシュと同様のモデル魚であり、視覚生理学でもよく用いられている。
348 また、突然変異体の作出やゲノム編集技術が良く応用されている^{50,51}。既にメダカの視細
349 胞のゲノム解析により、各オプシン遺伝子の配列が特定されている⁵²。さらに、大腸菌に
350 遺伝子を導入して作出されたオプシタンパク質にレチナールを添加することで再構築し

351 た視物質を用いた吸収スペクトル測定により、桿体および錐体に存在する合計 9 種類のオ
352 プシタンパク質の極大分光吸収波長が明らかになった⁵²。また、光がメダカの視覚に及
353 ぼす影響についての研究もいくつか報告されており、近年ではオプシンの組成や行動の季
354 節的变化⁵³が報告されている。しかし、メダカにおける視覚の閾値と分光視感度に関する
355 研究は、ほとんどない⁴⁴。そこで、本研究では、電気生理学における視覚閾値と分光視感
356 度の解析方法を確立するとともに、メダカの視覚閾値と分光視感度について明らかにする
357 ことを目的とした。

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

材料と方法

369

370

371 実験動物と倫理

372 供試魚には、近交系メダカ Hd-rIII1 (系統 ID:IB178) と d-rR-Tokyo (系統 ID:MT837)

373 を使用した。体サイズは 2~3 cm の受精後 3 か月以上経過した個体を使用した。また、こ

374 の系統の魚は NBRP Medaka (<https://shigen.nig.ac.jp/medaka/>) より分与を受けた。飼育

375 は、直方体のガラス水槽 (31.5×18.5×24.4 cm) を用い、水温 26±1°C 下で、白色 LED 光

376 (LDA6-G and LB1526G、株式会社ビームテック、日本) を用いた照明で 12 時間明期 12 時

377 間暗期とした。孵化直後から成魚まで、配合飼料 (株式会社キョーリン、日本) と市販のア

378 ルテミア休眠卵 (ブラインシュリンプ EGGS-90、株式会社キタムラ、日本) から孵化させた

379 ノープリウス幼生を給餌した。全ての実験は、鹿児島大学動物実験ガイドラインに従って行

380 った。(動物実験承認番号 F20002) 。

381

382 網膜組織の観察

383 供試魚には、12 時間以上暗順応させた魚と明順応させた魚を用いた。魚体をブアン氏固

384 定液で 4°C 下、24 時間固定し、70%から 100%まで段階的に各 1 時間ずつエタノールによる

385 脱水を行った。次に、キシレンに 1 時間浸漬させる工程を 3 回行った。得られたサンプルを

386 パラフィンに包埋し、6 μm の厚さに薄切した。次に常法に従ってヘマトキシリン&エオシ

387 ン染色を行い、カバーガラスで封入し、光学顕微鏡下で観察を行った。

388

389 網膜からの視細胞の単離

390 供試魚は、12 時間以上暗順応させた魚を用いて、暗室内で 3-アミノ安息香酸エチルメタ
391 ンスルホン酸塩 (MS-222) で過剰麻酔し安楽死させたのちに、近赤外線 LED の下で暗視ス
392 コープを設置した顕微鏡下で外科的処理を行った。眼全体を摘出して、冷却した生理食塩水
393 (pH7.2) に浸しピンセットとマイクロハサミで網膜を剥離させた。網膜断片を切り出しス
394 ライドガラスの上に移し、生理食塩水と共に封入した。封入後は軽くカバーガラスを押すこ
395 とで視細胞が重ならないように散らした。個々の視細胞の形態を光学顕微鏡下で観察した。
396 視細胞の形態の分類には、Nishiwaki et al.,⁵⁴ と Hawryshyn et al.,⁵⁵ を参考にした。また、視細
397 胞の外節の長さは ImageJ で計測した。

398

399 網膜電図 (ERG) の記録システム

400 網膜電図記録装置は以下のとおりである (Fig.2. 1,2)。ERG の記録装置は、ファラデーケ
401 ージの中に設置した。刺激装置は、市販の 100W キセノンライトを光源に用いた。集光レン
402 ズ (MLS-60P、モリテックス株式会社、埼玉、日本) を接続したライトケーブル (Straight 1000L
403 φ5、朝日分光株式会社、日本) は、研究室で作製した干渉フィルターとカラーフィルターを
404 制御できる装置に接続した。この装置は、シャッター (F77-4、駿河精機株式会社、静岡、日

405 本)と4つのフィルターホイール(6ホイール、Φ25mm、フィルター)より構成されている。

406 各フィルターホイールはRCサーボモーター(GWS12、Servo-Tech、秋月電子通商株式会社、

407 東京)に接続されている。全てのホイールの動きはパソコン上のコントロールボードで制御

408 した。2つのホイールには、9つのNDフィルターを搭載し、残り2つのホイールには10種

409 類の干渉フィルターを搭載した。NDフィルターは、0.2、0.3、0.6、0.9、1、1.5、2、2.5、3

410 log unitのものを用いた。それらのNDフィルターは、0.2-0.5 log unitのステップ間隔とし、

411 各フィルターを組み合わせで光路の前に設置した。6つの光波長(380 nm、470 nm、500nm、

412 520 nm、580 nm、620 nm)をメダカの視覚範囲より選定した。また、各フィルターの半値幅

413 (FWHM)は、8.7~11.4 nmである。刺激光強度は、分光放射照度計(CL500A、コニカミノ

414 ルタ株式会社、東京、日本)を用いて、供試魚の眼の範囲に適合するように設置し実験の前

415 に計測した。放射照度計で計測した放射照度(W/m^2)は、光量子密度(PFD, photon flux density,

416 $\mu mol m^{-2} s^{-1}$)に変換した。シャッターは、パソコンで制御し、刺激期間は50 msとした。応

417 答の記録には、基本的な電気生理機器を用いた。ガラス電極から得られるシグナルは、AC

418 アンプ(MEG-1200、日本光電工業株式会社、日本)で増幅され、デジタル化は1 kHzでサ

419 ンプリングされたAD変換器(PowerLab 4/20、ADInstruments Ltd、Dunedin、New Zealand)

420 と記録用のデータソフトウェア(Chart8, ADInstruments)に記録した。一回の記録は、250 ms

421 で光刺激が行われ合計1024 ms記録した。

422

423 暗条件と明条件下での ERG 記録の工程

424 全ての ERG 記録は、室温 20°C で午後から行った。明条件下での実験は、暗室でフルスペ
425 クトル LED ライト (GLRX122/FS、株式会社ボルクスジャパン、日本) を天井に向けて照射
426 し、実験中はメダカが明条件となるようにして実験した。メダカを配置した場所では、380-
427 620 nm の光の波長が含まれ、光量子束密度は、 $1.95 \times 10^{-5} \sim 2.00 \times 10^{-3} \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった。
428 メダカは、暗条件と明条件で合計 21 尾を使用した。

429 初めに、目視でメダカの眼球に異常がないことを確認した。次に MS222 にて浸漬麻醉後
430 に不動化させるために、筋弛緩剤であるガラミントリエチオダイド (Gallamine triethiodide、
431 富士フィルム和光純薬株式会社、日本) (0.8 mg/ml) に浸漬した。これらの方法は、Matsubara
432 et al.⁵⁶ を参考に実施した。不動化した魚を記録ステージに移動させ、実験中は口から鰓へ新
433 鮮な水を灌流させた (Fig.1.2)。また、キムタオル (日本製紙クレシア株式会社、日本) 片
434 を湿らせて魚体の上に置くことで魚体の乾燥を防いだ。ガラス電極には、3M の KCl を充填
435 させ記録に用いた。電極の先端は、直径が約 15 μm となるように調整した。信号を増幅器へ
436 送るために Ag/AgCl ワイヤーをガラス電極に挿入した。もう一方の、Ag/AgCl ワイヤーは、
437 基準電極とし魚体の下に設置し、記録電極の先端は、角膜の中央部に固定した。光刺激は、
438 メダカの眼に直角に照射するように鏡を設置した。記録は、同じ刺激に対して少なくとも 3
439 回行き平均を求めることで、S/N 比の向上を試みた。

440

441 閾値決定方法

442 メダカを用いて各光刺激に対する応答を記録し、応答記録を新しく開発した分析方法に
443 供した。この方法を使用することで、記録した波形に ERG の応答波形があるかないかを判
444 定することができる。初めに、光波長ごとに異なる光強度 (PFDs) の刺激をメダカに与え
445 て、得られた波形を低域通過フィルター (30 Hz フーリエフィルター) に供した。これによ
446 って S/N 比の向上と心拍ノイズの除去に効果が見られた。そして、最大光刺激強度 (PFD)
447 で刺激して得られた波形と、記録した全ての波形を比較した。異なる光刺激によって ERG
448 記録で得られた波形は、閾値レベルでも正の方向への b 波のシフトや負の方向への c 波の
449 シフトのような識別可能な特徴を持っていた。しかし、b 波の最大振幅が得られる時間 (遅
450 延時間) と b 波の振幅は刺激の強さによって異なることが観察された。そこで、波形の相似
451 性を最大刺激強度 (PFD) で得られた明瞭な波形と各光刺激 (PFD) によって得られた波形
452 を相互相関関数 $C_f(\tau)$ と相互相関係数 $R_g(\tau)$ によって計算した。

453
$$C_{fg}(\tau) = \overline{f(t)g(t+\tau)} \quad (1)$$

454
$$R_{fg}(\tau) = C_{fg}(\tau) / \sqrt{C_f(0)C_g(0)} \quad (2)$$

455 $f(t)$ は、最大光刺激 (PFD) から作成された平均波で $g(t)$ は、他の光刺激によって得ら
456 れた平均波である。 $C_{fg}(\tau)$ が最大値を示した時の τ の値は、最大光刺激 (PFD) の記録時
457 のピーク時間 $f(t)$ に対する b 波の最大応答振幅に達する時間の遅れ $g(t)$ と定義した。
458 ERG の波形の有無を、これらの 2 つの基準 $C_{fg}(\tau)$ と $R_{fg}(\tau)$ によって決定した。この方

459 法の詳細については、結果で述べる。

460

461 暗所および明所下での視感度の推定

462 b波を指標とした ERG の応答振幅と log 刺激強度 (PFD) の関係性を、各刺激波長で解析
463 し、異なる光波長に対する弁別能を比較した。波長間で異なる光刺激強度に対する各実験魚
464 の b 波の応答振幅の大きさのデータは、各個体間で得られる最大応答振幅で正規化し、そし
465 て得られたデータを 3-5 匹の間で平均化した。得られた平均値のデータは、Zettler の変法を
466 用いた Naka-Rushton の式に回帰させた⁴⁸。

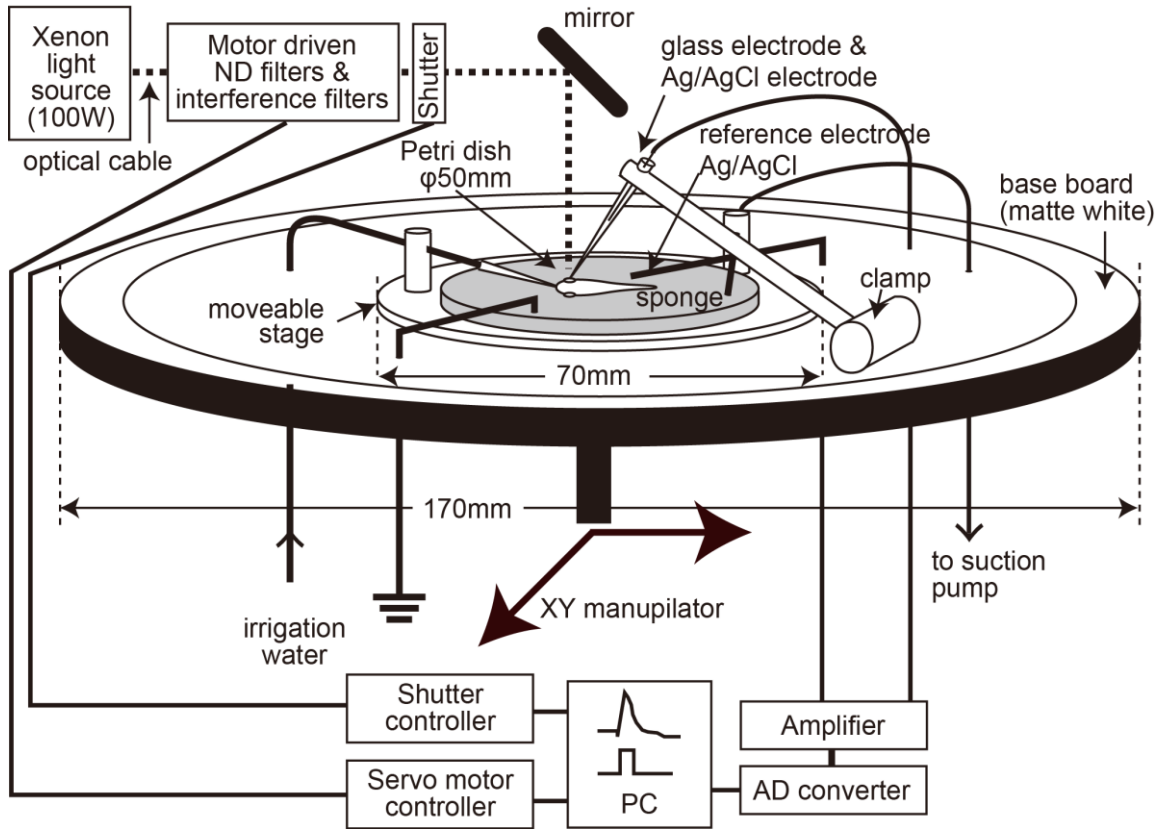
$$467 \quad V/V_{max} = I^m / (I^m + K^m) \quad (3)$$

468 V は b 波の応答振幅を表し、 I は刺激した光強度 (PFD)、 K は最大応答強度 (V_{max}) の半分
469 の値を引き出す光強度 (PFD)、 m は $V/\text{Log}I$ 曲線の傾きを示す。一般的に $\text{Log}K$ は、相対視
470 感度に用いられる。

471

472

473



474

475 Fig.2. 1

476 Schematic illustration of the ERG recording system.

477

478

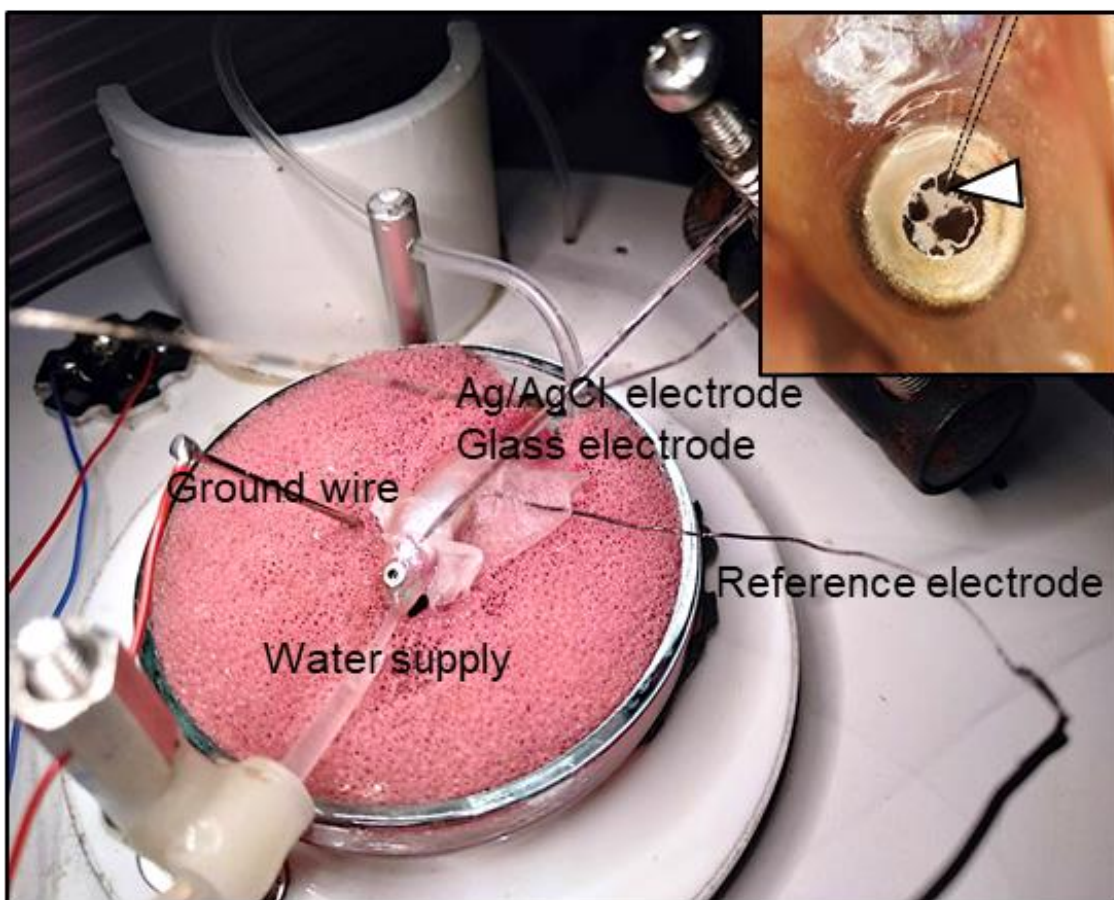
479

480

481

482

483



484

485 Fig.2. 2

486 Arrangement of recording stage. Tip of glass microelectrode was placed on cornea at the
487 edge of pupil (upper right).

488

489

490

491

492

493

結果

494

495

496 網膜運動反応と視細胞外節の長さについて

497 メダカの網膜上では網膜運動が観察された。明順応状態の網膜では、黒色素層に桿体細胞

498 の外節が伸長して貫入している様子が観察された (Fig.2. 3A)。錐体細胞は、外限界膜にそ

499 って並んでいる様子が見られた (Fig.2. 3A)。一方、暗順応状態の網膜では、黒色素層が縮

500 み桿体細胞と錐体細胞が外限界膜上に並ぶ様子が観察された (Fig.2. 3B)。また、押しつぶ

501 した標本から1つの桿体細胞と3つの錐体細胞の種類が同定、観察された (Fig.2. 4A-D)。

502 これらの視細胞の同定は、形態によって同定した。メダカの視細胞は、5つの種類があるこ

503 とが報告されている⁵⁴。1つは、桿体細胞で、残りの4つは短単錐体、長単錐体、短双錐体、

504 長双錐体である。しかし、本研究では長双錐体が見られなかった。また、これらの視細胞の

505 外節の長さを計測した (Fig.2. 4E)。桿体細胞の平均外節長は $34.9\mu\text{m}$ ($n=30$) であり、こ

506 の細胞は他の視細胞の外節に比べて極めて長かった。短単錐体、長単錐体、短双錐体の外節

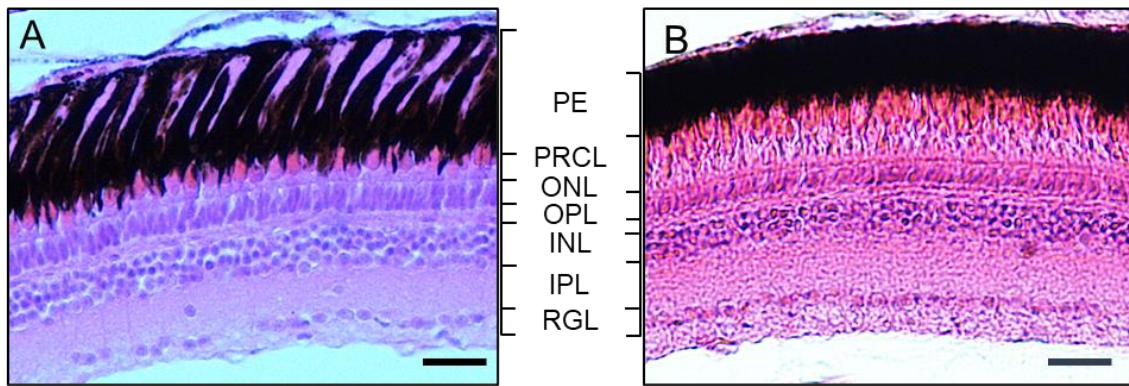
507 の長さは、各 $14.2\mu\text{m}$ ($n=17$)、 $7.3\mu\text{m}$ ($n=14$)、 $8.2\mu\text{m}$ ($n=24$) であった。特に、目

508 視での観察では短双錐体の左右の外節長に差が見られなかった。

509

510

511



512

513 Fig.2. 3 Retinal structure and photoreceptors of Medaka.

514 (A) Light adapted retina. (B) Dark adapted retina

515 PE, pigment epithelium; PECL, photoreceptor cell layer; ONL, outer nuclear layer;
 516 OPL, outer plexiform layer; INL, inner nuclear layer; IPL, inner plexiform layer; RGL,
 517 retinal ganglion layer.

518 Scale bar: 20 μ m

519

520

521

522

523

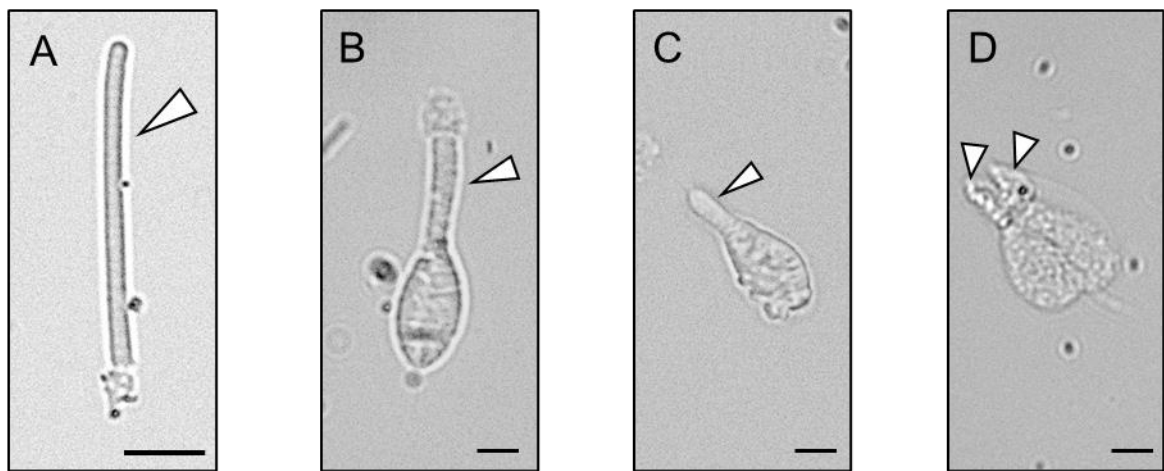
524

525

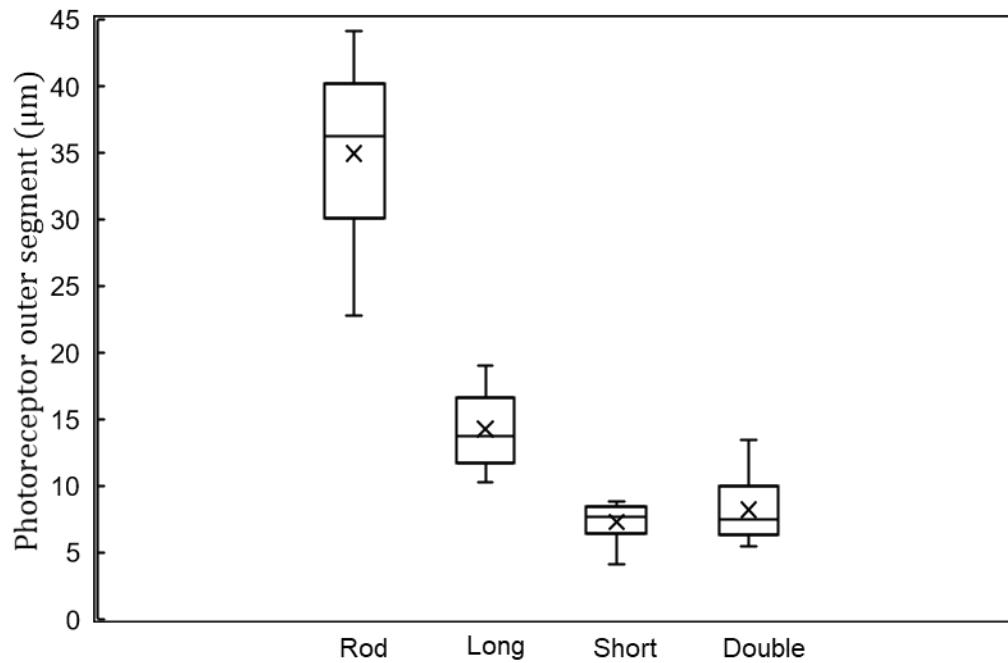
526

527

528



E



529

530 Fig.2. 4 Retinal structure and photoreceptors of Medaka.

531 (A) rod photoreceptor cell, (B) long cone cell, (C) short cone cell, (D) double cone cell,
 532 and E, comparison of the lengths of outer segments of each type of photoreceptor cell.

533 White arrow indicates the outer segments of photoreceptors.

534 Scale bar: 10 μm

535

536

537

538

539 刺激時間間隔の決定と信号記録からのノイズ除去について

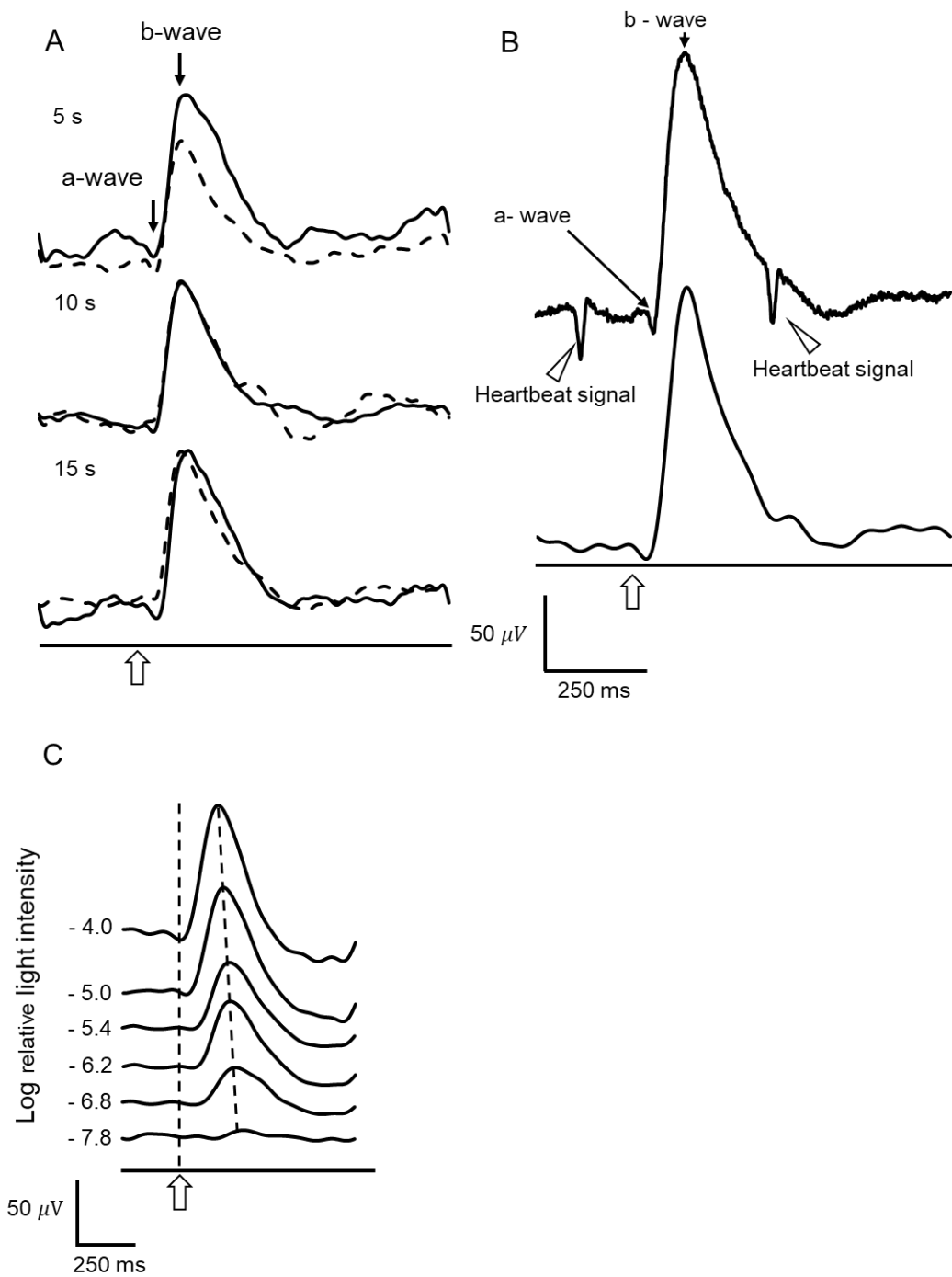
540 ERG の応答を記録する際に、適切な刺激間隔時間 (interstimulus interval : ISI) の検討を行
541 った。b 波の振幅を指標として同じ刺激強度の刺激で 2 回の応答を記録し、初めの 1 回目の
542 記録から 5、10、15 秒後の異なる刺激間隔時間で 2 回目の記録を行った。暗所下の ERG 記
543 録では、10 秒以上の刺激間隔時間をあけることで、1 回目の刺激と 2 回目の刺激時の b 波
544 の応答振幅に差は見られなかった (Fig.2. 5A)。明所下での ERG 記録では、5 秒間の刺激間
545 隔時間でも b 波の振幅に差は見られなかった。これらのことから、暗所下での ERG 記録は
546 刺激間隔を 10 秒とし明所下での ERG 記録は刺激間隔を 5 秒と定め応答を記録した。記録
547 の際に、心拍や鰓の動きからなる電気的な混入が見られた。低周波フィルターで濾波するこ
548 とで効率的にそれらの不必要な応答を取り除くことができ、かつ S/N 比を向上させること
549 ができた (Fig.2. 5B)。各ステップにおける典型的な ERG 波形を示す (Fig.2. 5C) (照射波長
550 $\lambda_{\max} = 520 \text{ nm}$)。異なる光強度に対する b 波と、それに伴う波形の形状は相似していたが、
551 b 波の最大応答振幅は光刺激強度の減少に伴って小さくなった。また、b 波の潜時も光刺激
552 強度の減少に伴って遅くなった。

553

554

555

556



557

558 Fig.2. 5

559 Properties of ERGs waveforms in different experimental protocols.

560 (A) Comparison of ERG waves in response to 2 repeated stimuli with different stimulus
 561 intervals. Solid and dotted waves indicate response wave to the 1st and 2nd stimulus,
 562 respectively. Clear reduction in the 2nd wave was found when stimulus interval was 5 s.

563 (B) Elimination of heartbeat contamination in the ERG wave by the FFT filter. The
564 arrowheads showed heartbeat signals. (C) Typical ERG waveforms to flash light
565 stimulus (50ms) at wavelength 520nm. The magnitude of ERG b- wave decreased
566 following stimulus PFD reduction while the peak time difference increased. Arrowhead
567 indicates the time of stimulus onset. The numbers indicate the log PFDs of stimuli.

568

569

570

571

572

573

574

575

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

588

589

590

591

592

593

594

595

596

597

598

599 **b 波のピークタイムの差と光刺激強度(PFD)、相互相関関数と光刺激強度(PFD)**

600 **の関係について**

601 ERG の波形の相似性の比較過程の一例を Fig.2. 6 の a から c に示した。強い PFD に反応

602 した ERG の波形は、ある弱い光刺激を与えた時の応答に対して大きな振幅を示し、b 波の

603 最大応答振幅の出現時間も早くなった (Fig.2. 6A)。次に、強い光刺激を与えた時に得られ

604 た波形の b 波の振幅と弱い光刺激を与えた時に得られた波形の b 波の振幅を正規化し同じ

605 規格にした。そして得られた 2 つの波形からピークタイムの差 (τ) を得るために相互相関

606 分析に供した (材料と方法 : 公式 1) (Fig.2. 6B)。最後に、相互相関係数 ($R(\tau)$) を 2 つの

607 波形の時間を一致させるために公式 2 を用いた。基準となる τ と $R(\tau)$ の適切な関係を確

608 認するために、それらの基準値と光刺激強度 PFD との関係性をプロットし、それらの関係

609 性を観察した (Fig.2. 7)。それらの関係性の典型例として、暗所下で 520 nm の光刺激を与

610 えた時に得られたデータと明所下で 500 nm の光刺激を与えた時に得られたデータを示す。

611 また、全ての刺激波長でこの関係性をテストし確認した。暗所下、および明所下共に光刺激

612 強度 PFD の減衰と共に b 波のピークタイムの差 (τ) が大きくなった (Fig.2. 7A, C)。一方、

613 光刺激強度 PFD の減少に伴い、相関係数の低下が見られた (Fig.2. 7B, D)。これらのグラフ

614 から、光刺激強度 PFD の減衰と共にピークタイムの差 (τ) と相関係数の関係性が崩れる点

615 が示された。注目すべきことは、同じ光刺激強度 PFD で、相関係数とピークタイムの差 (τ)

616 の関係性が崩壊した点が出現したことである。記録された全ての ERG の波形を目視で確認

617 し、数値解析で得られた相互相関係数とピークタイムの差の傾向を比較することで記録さ
618 れた波形に ERG の応答が含まれるかどうか判定する適切な τ と $R(\tau)$ を確認した。結果と
619 して本実験では、暗所下では $\tau \leq 150$ ms で、明所下では $\tau \leq 120$ ms、相互相関係数 $R(\tau) >$
620 0.7 が適切な条件であることを結論付けた。

621

622

623

624

625

626

627

628

629

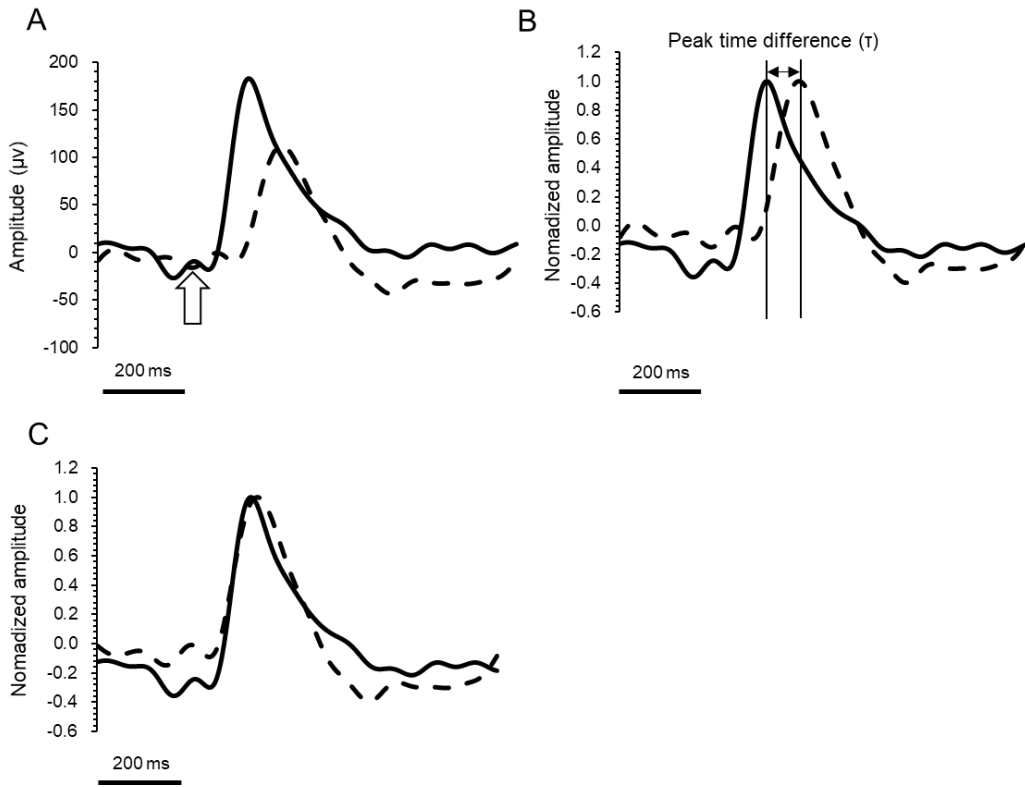
630

631

632

633

634



636

637 Fig.2. 6

638 Example of data processing to compare the similarity of ERG waves (A-C) and
 639 relationships between peak time difference (τ) and correlation coefficients ($R(\tau)$) vs.
 640 photon flux densities recorded to 520 nm stimulus wavelengths under scotopic and
 641 photopic conditions. Each group data shown as example (A-C, D and E, F and G) were
 642 obtained from the same individuals. (A) ERG waves in response to different light PFDs.
 643 Solid and dotted waves indicate mother wave (reference wave) and comparison wave. (B)
 644 Waveforms after normalizing those magnitudes. (C) overlay of waves after adjusting peak
 645 time differences by cross correlation analysis. The arrows indicate the time stimulus light
 646 onset.

647

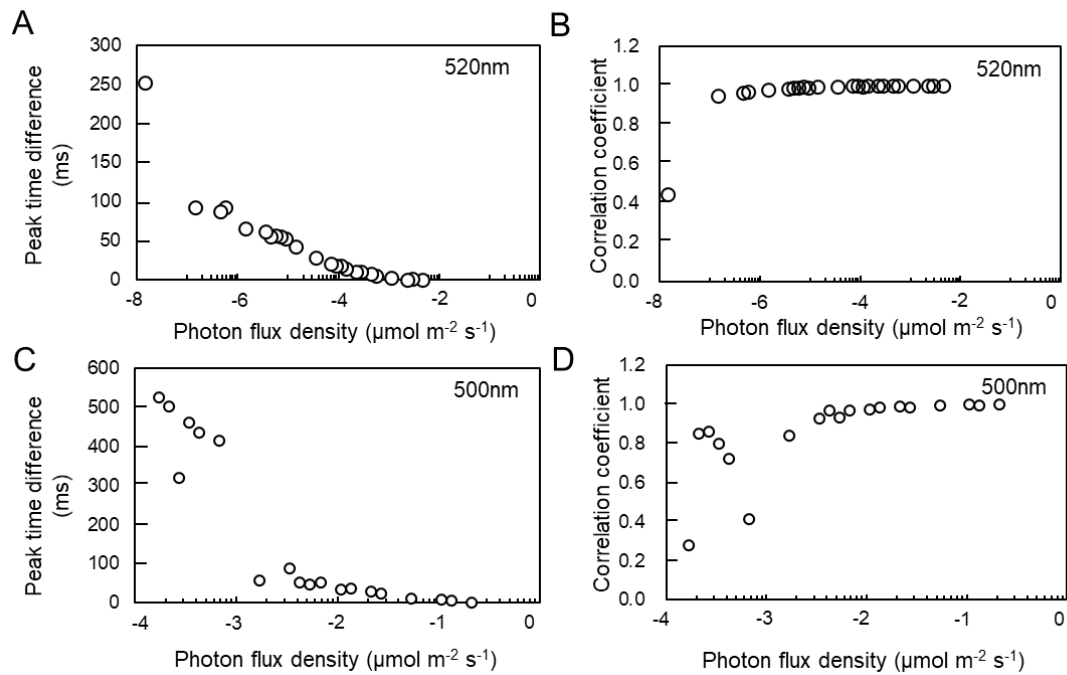
648

649

650

651

652



653

654 Fig.2. 7

655 Example of data processing to compare the similarity of ERG waves (A-C) and
 656 relationships between peak time difference (τ) and correlation coefficients ($R(\tau)$) vs.
 657 photon flux densities recorded to 520 nm stimulus wavelengths under scotopic and
 658 photopic conditions.

659 Relationships between peak time differences and stimulus PFDs under scotopic (A) and
 660 photopic conditions (C). Relationships between correlation coefficients and stimulus
 661 PFDs under scotopic (B) and photopic conditions (D).

662

663

664

665

666

667

668 メダカの分光視感度と絶対閾値について

669 $V/\log I$ データは、各個体の V_{max} で正規化し、平均のデータは Naka-Rushton の方程式⁴⁸
670 に最小二乗法を用いて回帰させた (材料と方法 公式 3)。推定された曲線の傾きは、各波
671 長で感度に応じて曲線の位置が異なるが、全ての波長でほぼ同じ傾向を示した (Fig.2. 8a,b)。
672 $\log K^{-1}$ で定義される視感度は、暗所下で 520 nm、明所下で 500 nm の光刺激を与えた時に
673 得られた最大値で正規化した値を用いた。暗所における比視感度は、520 nm で最大値を示
674 し 470 nm で 0.78、380 nm で 0.73、580 nm で 0.69、620 nm で 0.52 であった (Fig.2. 8C)。明
675 所では、500 nm で最大値を示し 520 nm で 0.98、470 nm で 0.92、580 nm で 0.87、620 nm で
676 0.82 であった (Fig.2. 8D)。他の視感度の指標としてダイナミックレンジがあり、各波長の
677 からダイナミックレンジを推定した。ダイナミックレンジは、 V_{max} に対する応答電圧の 5-
678 95%の範囲で求められる \log PFD の値と定義した。それらの式から導き出されたダイナミッ
679 クレンジは、暗所で 2.64-3.68 であり明所では 1.39-1.99 であった。本研究で開発した技術を
680 元に視覚閾値の決定を行ったところ、暗所下では 520 nm で最も低い値を示し明所下では
681 380nm で最も低い値を示した (Fig.2. 9A, B)。暗所下における各波長の視覚閾値は、520 nm
682 で $3.17 \times 10^{-7} \pm 8.00 \times 10^{-8} \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (means \pm s.e)、470 nm で $1.10 \times 10^{-6} \pm 0.00 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、380
683 nm で $1.02 \times 10^{-6} \pm 3.15 \times 10^{-7} \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、580 nm で $3.15 \times 10^{-6} \pm 8.13 \times 10^{-7}$ そして、620 nm で 2.49×10^{-6}
684 $\pm 8.34 \times 10^{-6}$ であった (Fig.2. 9A)。明所下における各波長の視覚閾値は、380 nm で最も低い
685 値を示し、380 nm で $2.58 \times 10^{-4} \pm 1.49 \times 10^{-4} \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (means \pm s.e.)、520 nm で 8.73×10^{-4}

686 $4 \pm 3.59 \times 10^{-4} \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、500 nm で $1.58 \times 10^{-3} \pm 5.54 \times 10^{-4} \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、580 nm で $2.68 \times 10^{-3} \pm 8.96 \times 10^{-4}$ 、470 nm で $3.90 \times 10^{-3} \pm 1.01 \times 10^{-3} \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、620 nm で $4.91 \times 10^{-3} \pm 3.03 \times 10^{-3} \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ であった (Fig.2. 9B)。

689

690

691

692

693

694

695

696

697

698

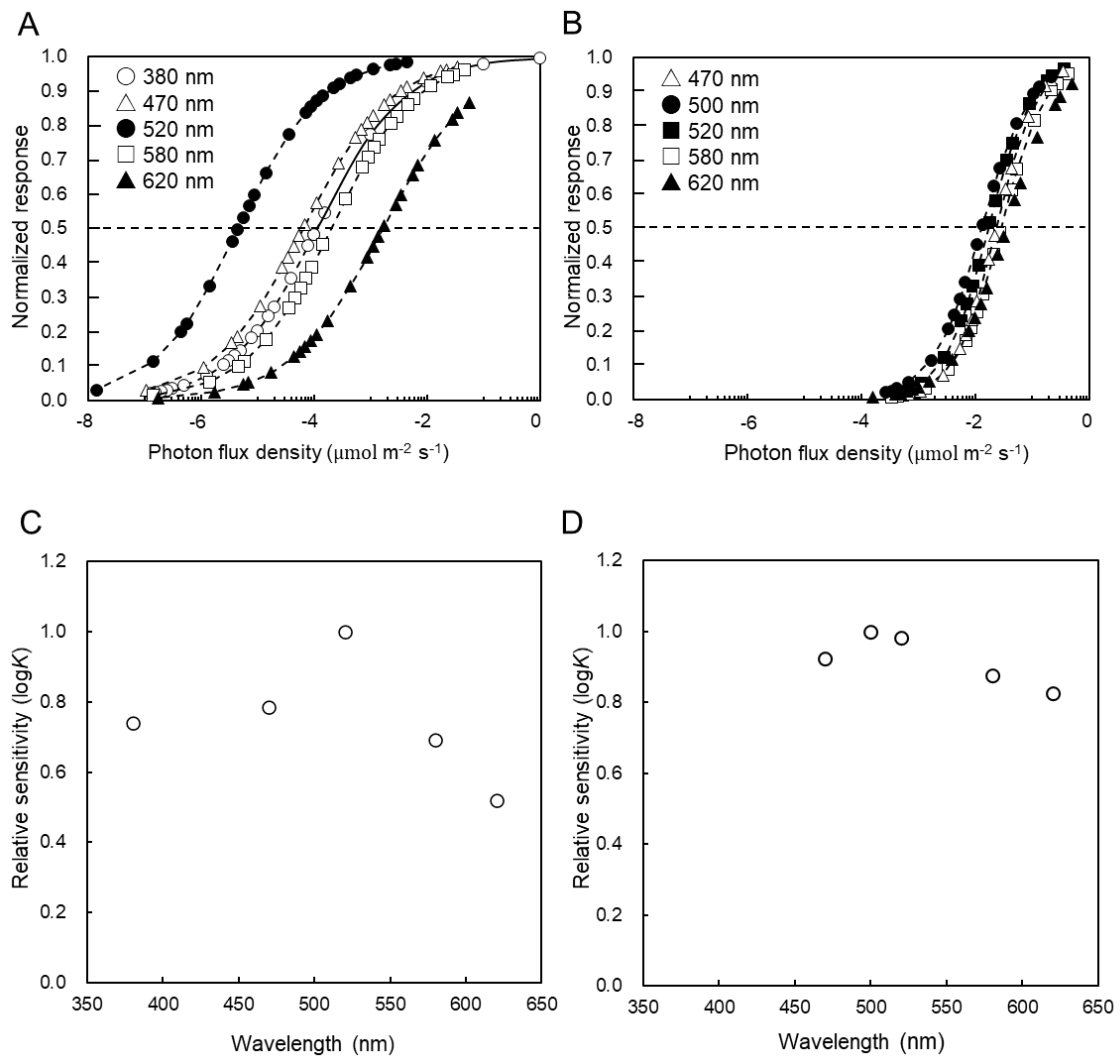
699

700

701

702

703



704

705 Fig.2. 8

706 Relationships between stimulus photon flux density and ERG b-wave magnitudes in
 707 each stimulus wavelength of light.

708 (A) Normalized ERG magnitudes scotopic data were fitted to Zettler modified Naka-
 709 Rushton equation. Dotted line of curve in 380nm indicates extrapolation curve based on
 710 the estimated V_{max} in scotopic condition.

711 (B) Normalized ERG magnitudes photopic data were fitted to Zettler modified Naka-
 712 Rushton equation. In photopic, 380 nm data was omitted Zettler modified Naka-
 713 Rushton equation. Because light of 380 nm was not enough light intensity for stimuli.

714 (C) Relative spectral sensitivity expressed as $\log K$. K is the photon flux density induce
 715 50% of maximum response magnitude in each wavelength in scotopic condition.

716 (D) Relative spectral sensitivity expressed as $\log K$. K is the photon flux density induce
717 50% of maximum response magnitude in each wavelength in photopic condition.

718

719

720

721

722

723

724

725

726

727

728

729

730

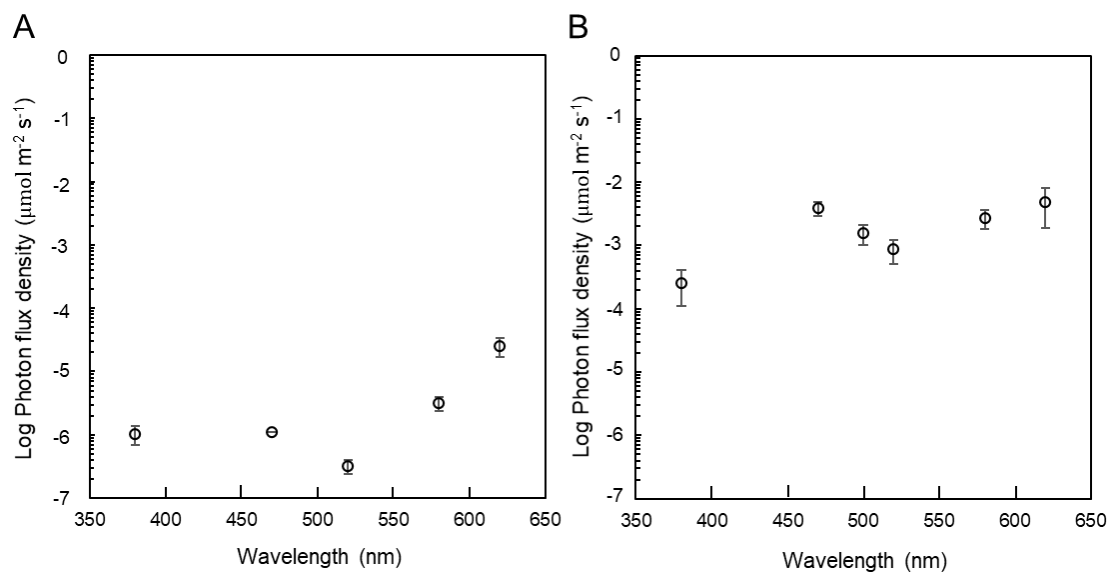
731

732

733

734

735



736

737 Fig.2. 9

738 Threshold photon flux densities in scotopic (A) and photopic (B) vision determined by
 739 the method developed in this study. Open circles show mean PFDs and bars indicate
 740 standard error.

741

742

743

744

745

746

747

748

749

考察

750

751

752 本章では、典型的な緩電位のシフトを示す ERG 波形を相互相関解析アルゴリズムに適応

753 することで、記録された信号の中に ERG 応答が含まれるかどうかを判定する客観的な解析

754 手法を確立した。この相互相関関数を用いた分析方法は、閾値を決定することを簡便にした。

755 さらに、目視による閾値判定のみを使用することに起因する潜在的なバイアスを回避する

756 ことができる可能性を示した。この波形の相似性を用いた方法は魚類の聴覚研究で報告さ

757 れている方法と類似の方法である。魚類の聴覚研究では、聴性脳幹反応検査 (ABR : auditory

758 brainstem response) が用いられており同じ音刺激を繰り返し記録することで比較する方法で

759 ある^{57,58}。この考え方の基本は、録音信号が音刺激に対する応答成分を持っている場合、位

760 相同期信号 (刺激波に同期した応答信号) が必ず平均化した記録中に残っていることで、ラ

761 ンダムノイズを大幅に減らすことができることである。結果として、対になった記録音の波

762 形から同じ波形が得られ、回帰分析によってその相似性を比較することができる。Yan⁵⁷の

763 報告では、様々な強さの異なる音の刺激を与え相互相関係数 r と目視による観察とで記録を

764 2 回行っている。そして、 $r > 0.3$ が与えられた刺激に対する応答が含まれているかどうかを

765 判断するための閾値であることを発見した。本研究における視覚の研究では、刺激時の PFD

766 と相互相関係数の関係の観察に基づいて定義された以下の値、暗条件下で相互相関係数 $r >$

767 0.7 でかつピークタイムの差である τ は、 $\tau < 150 \text{ ms}$ で、明条件下では $r > 0.7$ で $\tau < 120$

768 ms を基準として設定した。

769 今回、新しく作成したワークシートを用いて分析する際に、全ての記録波形を確認した。

770 さらに、このテンプレートマッチングメソッドによる判定は、実験者の目視による判定より

771 少なくとも精度が高いか、更に正確であると評価した。しかしながら、最も重要なことは、

772 ノイズを低減させ S/N 比を向上させた質の高い応答記録を用意することである。このテン

773 プレートマッチングメソッドの最も有用な点は、記録応答を迅速に評価することを実験系

774 に取り入れることで、閾値未満の不必要な刺激を減らすことを可能にしたことである。この

775 ことは、ゼブラフィッシュやメダカのような弱く小さなモデル動物で実験をする際にとて

776 も重要であり、実験時間の短縮は安定して記録を取り続けるために必要不可欠な要因であ

777 る。

778 本章では、暗条件下において 520 nm での刺激で最も高い視感度を示し、明条件下では 500

779 nm の刺激で最も高い視感度を示した。視感度の調整は、視細胞外節にある視物質と様々な

780 光受容体の組成によって決定されることが提唱されている。一般的に硬骨魚類では、RH1

781 (rod opsin)、SWS1 (UV)、SWS2 (blue)、RH2 (green) と M/LWS (red) が分類されてい

782 る⁵⁹。Matsumoto et al.,⁵²では、メダカは全てのタイプのオプシンを持つことを報告してい

783 る。可視光域では、2つのSWS2 (SWS2a、SWS2b) と M/LWS (M/LWSa、M/LWSb) と3つ

784 のRH2 (RH2a、RH2b、RH2c)を持つ⁵²。これらの極大吸収波長 (λ_{max}) は、合成タンパク

785 質に 11-シスレチナール (ビタミン A1 発色団ベース) を添加した物を顕微分光吸収計測法

786 によって測定し決定されている⁵²。各オプシントタンパク質の (λ_{max}) は、RH1 が 502 nm :
787 SWS1 が 356 nm, : SWS2a, SWS2b が 439、405 nm : RH2a, RH2b, RH2c が 452、516、492
788 nm : M/ LWSa, M/LWSb が 561、562 nm であった⁵²。ERG の記録によって得られた最も高
789 い感度を持つ波長は、RH1、RH2b、RH2c、M/LWSa、M/LWSb の吸収曲線と重ね合わさって
790 いた。残念ながら、得られた ERG の波長に対して、どのオプシントタンパク質がどの程度寄
791 与しているかについては不明である。少なくとも、暗条件下では桿体細胞 (RH1) が大きく
792 寄与していることが考えられる。加えて、これらの各オプシントタンパク質がどの程度寄与して
793 いるかについて明らかにするためには、顕微分光吸収計測法 (MSP : microspectrophotometry)
794 や阻害剤による薬理的な処理等を施した個体を用いた ERG の記録などを生体レベルで実験
795 することで視細胞の分光特性を明らかにできる。

796 Allison et al.,⁶⁰ では、甲状腺ホルモン (Thyroid hormone) を投与する薬理処理技術を用い
797 て、ゼブラフィッシュにおける視物質の交換システムを明らかにした。この視物質の交換シ
798 ステムは、波長調節機能がありこれは、11-シスレチナール (ビタミン A1 発色団ベース) と
799 3,4 デヒドロレチナール (ビタミン A2 発色団ベース) の各発色団の構成比によって決定さ
800 れる。今回は、UV 波長帯が 2 番目に高いピークを示した。メダカが UV に対して感度を持
801 つことは、Matsumoto et al.,⁵² や Hisatomi et al.,⁶¹ が既に報告し、ゼブラフィッシュでも同様
802 に報告がある⁶²。メダカで、UV 波長に対して感度が高いことにどのような役割があるかは
803 不明であるが、他魚種では UV 波長帯に対して感度が高い理由に摂餌との関係を指摘して

804 いる⁶³。

805 メダカの閾値に閏数する報告は本研究が初めてであり、暗所下での閾値は、520 nm で 3.17
806 $\times 10^{-7} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ であり、620 nm で $4.67 \times 10^{-5} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ であった。他魚種では行動試験によ
807 る視覚閾値を報告した例はいくつかあり、暗所下における Atlantic mackerel *Scomber*
808 *scobruswo* を用いた群行動による閾値決定では、 $1.8 \times 10^{-7} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ⁶⁴、Californian anchovy
809 *Engraulis mordax* では $3.0 \times 10^{-6} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ⁶⁵、そして、Pacific jack mackerel *Trachurus*
810 *symmetricus* では $1.1 \times 10^{-6} \text{ mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ⁶⁶ が報告されている。近年では、ニホンウナギのレブ
811 トセファルスを用いた閾値決定が報告されており、その値は 400 nm から 500 nm の範囲で
812 $7.22 \times 10^{-4} \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ であった⁶⁷。これらの先行研究と本研究のメダカの視覚閾値を比べる
813 と、メダカは他のいくつかの魚類と同様に高い視感度有していることが示された。

814 メダカやゼブラフィッシュのような小さなモデル魚における ERG の応答記録技術の開発
815 は、Makhankov, Y. V et al.,⁴⁴ と Matsubara et al.,⁵⁶ が報告している。また、その他の報告で
816 は、実験魚の制御に関するもので、電極の埋め込み方法や光刺激装置の改良が、応答記録の
817 効率化や正確性の向上を導くことが述べられている^{56,68-70}。分析方法に関係するところでは、
818 標準的な手順として Naka-Rsuhton の双曲線関数で表される公式にデータを回帰させ応答振
819 幅と PFD の関係を解析する方法⁷¹があるが、本実験からこれらの方法よりさらに簡便かつ
820 迅速に閾値決定ができることが示された。本実験結果より、メダカの視感度や閾値等の基礎
821 的な情報が得られ、次章の光照射実験をする際の光波長の選定と光強度の決定の基準とな

822 る。

823

824

825

826

827

828

829

830

831

832

833

834

835

836

837

838

839

第3章 特定の光波長照射によるメダカ生殖腺への 影響評価

背景

840 光は、水生生物にとって重要な環境要因の一つである。多くの動物で光周期や光強度が、
841 成長や生殖に及ぼす影響に関する生理学的なメカニズムについて、過去に研究例が存在す
842 る^{72,73}。一方、光波長の違いが生物に与える影響についての知見は乏しい。例えば、緑色光
843 を照射して、異体類を飼育すると MCH の分泌が促進され成長が良くなることが報告されて
844 いる^{36,37}。また、特定の光波長を照射することで、ストレスの軽減や摂餌に影響を及ぼすこ
845 とがいくつかの魚種で報告されている⁷⁴⁻⁷⁸。

851 一部の魚類では、水温、pH、飼育密度、光周期等の環境要因が性分化に影響をあたえ、性
852 転換が誘導される^{19,22,23}。これらの多くは、メスからオスへの性転換である。このオス化の
853 メカニズムは、環境要因の一つである高水温に暴露することによるものであるとする報告
854 がある。性分化期のヒラメを高水温に暴露することで、ストレスマーカーとして知られてい
855 るコルチゾルが過剰分泌される。このコルチゾルが、アンドロゲンからエストロゲンへの変
856 換酵素 P450 アロマターゼをコードする *cyp19a1a* の発現を直接抑制し、オス化を促進させ
857 る⁷⁹。また、ヨーロッパシーバス *Dicentrarchus labrax* では、性分化期に高水温に暴露す

858 ることで、*cyp19a1a* のプロモーター領域がメチル化し、P450 アロマターゼを制御しオス化
859 を誘導する可能性を指摘している⁸⁰。これらの研究例のように、水温刺激による性分化機構
860 については、メカニズムが解明されつつある。しかし、環境要因の一つである光波長が性分
861 化に影響を及ぼすことについては、報告がない。

862 メダカは、小型魚類であり世代間が短い。また、近交系が確立しており、性決定遺伝子が
863 同定されている等の特徴を持つモデル魚として知られている⁵⁰。生殖様式は、XX/XY 型の
864 オスヘテロの生殖様式をとり、性決定遺伝子 *dmy* (DM-domain gene on Y chromosome) が Y
865 染色体上にある^{12,13}。また、近交系メダカ Hd-rR111 系統および、d-rR-olvas-GFP 系統は、オ
866 ス・メスで体色の色が異なる。色素をコードするアレル *R*、*r* は Y 及び、X 染色体上に位置
867 する。つまり、オスでは、緋色をコードする *R* が Y 染色体上にあるので、 X^rY^R となり緋色
868 の体色となり、メスでは、白色の体色をコードする *r* が X 染色体上にあるので、 X^rX^r とな
869 り白色の体色となる。以上より、これらの系統は、体色と遺伝的な性は関連している。した
870 がって、遺伝的な性を体色によって見分けることが出来る。

871 基本的にメダカは、性決定遺伝子にしたがって性分化が進む。しかし、性分化期に高水温
872 に暴露、または飢餓状態にすることで遺伝的にメスでありながら表現型がオスとなる性転
873 換が誘導されることが報告されている^{81,82}。

874 前章で述べたとおり、魚類の網膜には光受容体となる視細胞が 2 種類存在していること
875 が知られている。そのうち、錐体細胞は色覚を司る細胞で、色の認識には錐体細胞の外節に

876 存在するオプシントタンパクと発色団であるレチナールが役割を果たしている。メダカは、8
877 つの錐体オプシン遺伝子を有することが報告されている⁵²。しかし、メダカの視覚機能の
878 解析についてはこれまで報告がなかった。第1章ではメダカを用いた網膜電図解析を行い、
879 明暗所における視感度及び閾値を明らかにしたことを報告した。この結果より、暗順応下で
880 は、520 nm の緑色帯で視感度および、閾値が低いことが明らかとなった。また、明所下で
881 は、380 nm に最も低い閾値を示したが、可視光域では、520 nm に最も高い視感度と低い閾
882 値を示した。暗所下では、明暗の識別をするために桿体細胞が寄与することが報告されてい
883 る。しかし、明所下では桿体細胞が黒色素層に貫入し錐体細胞が主に機能する。これらの一
884 般的な知見と、第1章で得られた知見を総合すると、メダカでは520 nm の緑色光域に高い
885 視感度と、低い閾値を有することが予想された。これらのことから本研究では、市販されて
886 いるLED光で緑色光域にピーク波長をもつ光源を使用し、近交系系統 Hd-rR111、d-rR-olvas-
887 GFP、ヒメダカの2系統と市販のメダカを用いて光照射試験を行い性分化にどのような影響
888 を及ぼすか検討した。次に、d-rR-olvas-GFP 系統を用いて性転換時期の推定を行い、Hd-rR111
889 系統を用いて性転換要因の一つと考えられているコルチゾル測定を行った。

890

891

892

893

材料と方法

894

895

896 実験動物と倫理

897 近交系メダカ Hd-rR111、d-rR-olvas-GFP は、バイオナショナルリソースメダカ (NBRP
898 medaka) から分与を受け、実験に使用した。また、ヒメダカは恒松養魚場 (鹿児島市) よ
899 り購入した個体を実験に使用した。給餌は 1 日に 2-3 回、配合飼料 (株式会社キョーリン、
900 兵庫県、日本) を与えた。全ての実験は、鹿児島大学における動物実験に関する規則に従っ
901 た。

902

903 飼育環境

904 ガラス水槽 (31.5×18.5×24.4cm) を暗幕で覆い、各色の LED 照射下で飼育を行った (LDA6-
905 G、LB1526G、ビームテック株式会社、埼玉県、日本)。水面から光までの距離は約 5cm と
906 し、光波長ピークは照度分光光度計 (CL-500A ; コニカミノルタ株式会社、東京、日本) を
907 用いて計測した。白色 LED は 451 nm、緑色 LED は 518 nm にピークがあった (Fig 3-1 A)。
908 飼育期間中の光周期は明期 14 時間、暗期 10 時間で制御し、水温は 26±1 °C に維持した。
909 孵化直後から成魚まで、配合飼料と市販の卵から孵化させたアルテミア (ブラインシュリン
910 プ EGG-90、株式会社キタムラ、京都府、日本) を給餌した。Hd-rR111 系統とヒメダカは、
911 孵化直後より光を照射して飼育を行い、交配試験は 90 日齢で行った。d-rR-olvas-GFP 系統

912 は、受精卵から光を照射して飼育を行い 30-50 日齢の個体を用いて性判別を行った。

913

914 稚魚期のメダカのオプシン遺伝子発現について

915 メダカでは、8つの錐体遺伝子、*LWS-A/LWS-B*、*RH2-A*、*RH2-B*、*RH2-C*、*SWS1*、*SWS2-A*、

916 *SWS2-B* を持つことが報告されている⁵²。オプシン遺伝子の発現を孵化したばかりのメダカ

917 (孵化3日後)を用いて解析を行った。各オプシン遺伝子プライマーは、Matsumoto et al.,⁵²

918 および Chinen et al.,⁸³らが報告しているものを用いた (Table 1)。LWS-A および LWS-B 遺伝

919 子は類似性の高い配列のため、Matsumoto et al.,⁵²と同様に種類のプライマーを使用し

920 LWS-A と LWS-B の判別を行わなかった。*ef1* は、内部標準遺伝子として用いた。1.5 ml チ

921 ューブに 1000 μ l の RNA 抽出液 (TRIzol RNA Isolation Reagents、サーモフィッシャーサイ

922 エンティフィック株式会社、アメリカ合衆国)を入れ、メーカーの指示に従ってホモジナイ

923 ズした。ReverTra Ace キット (ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover、東洋

924 紡株式会社、日本)を用いて cDNA を合成した。RT-PCR には、Bioline 社の酵素 (BIOTAQ

925 DNA Polymerase、Bioline Reagents Ltd、イギリス)を使用した。PCR 条件は以下の通りで行

926 った。95°Cで 30 秒、その後 95°Cで 30 秒、55°Cで 30 秒、55°Cで 30 秒を 40 サイクル行い、

927 72°Cで 1 分、80°Cで 8 秒加熱した。その後、アガロースゲルを用いて電気泳動を行いエチジ

928 ウムブロマイドで染色し、トランスイルミネーターで可視化した。

929

930 Table 1 PCR primer sets used for RT-PCR and genomic PCR.

RT-PCR			Reference	
gene name		5'-3'		
<i>LWS-A/B</i>	Forward	ATGAAGACACAACAAGAGGCTCTGC	matsumoto et al., 2006	
	Reverse	TTATGCAGGAGCCACAGAGGA		
<i>RH2-A</i>	Forward	ATGGAGAACGGCACAGAGGG		
	Reverse	GCAGTCCAGAGACGTCCGGCGTGGTCT		
<i>RH2-B</i>	Forward	CTCCGCTTCAAGAGAGTCCAAGGGAGCATC		
	Reverse	GCAATCACTGAAAGTGTCCACAAAAGCGAC		
<i>RH2-C</i>	Forward	GAAGCTCCAGAAGACCAAGCAAGCAGAC		
	Reverse	GGATCTTTTAAATGAAAGTGTTCAGACTTA		
<i>SWS2-A</i>	Forward	ATGAGGTTTCATCAGTGGTGGGGAGCTG		
	Reverse	CACTGATGTTGAGTCCTCCTCTTCTC		
<i>SWS2-B</i>	Forward	ATGAGGGGAAATCGTGTTGTGGAGTTT		
	Reverse	TGACTGGTTGAGGACTCTTCATCTTCGT		
<i>SWS1</i>	Forward	ATGAATGGCACAGAGGGACC		
	Reverse	TTATGCAGGGGACACAGAGCT		
<i>efl</i>	Forward	TGAGATGGGCAAGGGCTCCT		Horie et al., 2016
	Reverse	GCTGGGTTGTAGCCGATCTT		
Genomic PCR				
<i>dmy, dmrt1</i>	Forward	CCGGGTGCCCAAGTGCTCCCGCTG	matsuda et al., 2002	
	Reverse	GATCGTCCCTCCACAGAGAAGAGA		

931

932

933

934

935

936 遺伝的な性判別法

937 メダカの遺伝子型性は、*dmy* 遺伝子の有無と体色の観察により決定した。尾鰭からの 25
938 mm² の面積のサンプルを、500 μ l の cell lysis reagent (100 mM Tris-Cl, 5 mM EDTA、200 mM
939 NaCl、0.2% SDS、1 μ l Proteinase K) に溶解し、55°Cのインキュベーター中で 12 時間溶解し
940 た。10 分間遠心 (13,000 \times g) した後、上清を 500 μ l のイソプロパノールと混合し、沈殿物を
941 70%アルコールで洗浄した。ゲノム DNA を TE 緩衝液で溶出した。ゲノム PCR プライマー
942 は、Matsuda et al.,¹² によって報告されたものを使用した (Table.1)。用いたプライマーセ
943 ットは、1 つのプライマーセットで、*dmy* (1300 bp) と *dmrt1* (1000 bp) の 2 つの遺伝子を
944 検出することができる。*dmy* はオスにのみ存在し、*dmrt1* はオスメスともに存在する。そ
945 のため、ゲノム PCR では遺伝的なオスでは 2 つのバンドが現れ、遺伝的なメスでは 1 つの
946 バンドが現れる。ゲノム PCR には BIOTAQ DNA ポリメラーゼ (BIOTAQ DNA Polymerase,
947 Bioline Ltd. United Kingdom) を使用した。PCR 条件は以下の通りで行った。96°Cで予熱、
948 94°Cで 2 分間、その後 94°Cで 1 分間、55°Cで 1 分間、72°Cで 1 分間を 35 サイクル行った。
949 最後に 72°Cで 7 分間加熱した。Hd-rRII1 系統および d-rR-olvas-GFP 系統では、遺伝的なオ
950 スは緋色、メスは白色の体色を示す。このため、体色を、近交系及び d-rR-olvas-GFP の遺伝
951 子型の性を判別するために用いた。

952

953 表現型の性判別法

954 表現型の性を生殖腺の組織切片と背鰭と臀鰭の形状の観察により決定した。臀鰭と背鰭
955 の形状は、メダカの第二次性徴を表している。メスは丸く短い臀鰭を示すが、表現型のオス
956 は鋭く長い臀鰭を示す。また、表現型オスの背鰭は深く切れているが、表現型メスの背鰭は
957 切れ込みがない。生殖腺は Bouin 氏固定液で固定した (4°C)。固定された生殖腺を、70%か
958 ら 100%までのエタノール系列で脱水し、キシレンによって透徹した。全ての工程は、振盪
959 機 (Wave-SI; タイテック株式会社、日本) 上で行った。生殖腺をパラフィンに埋め込み、ミ
960 クロトーム (HM 315 S; MICROM international GmbH, Ltd. Germany) により 4~6 μ m の範囲
961 で薄切した。作製した薄切切片をヘマトキシリンとエオジン (H&E) で染色した。切片をキ
962 シレン中で 5 分間脱パラフィン化し、99%から 70%までのエタノールで脱水した。2 分間
963 ヘマトキシリンで染色された切片と 10 分間エオシンで染色された切片を水道水で洗浄した。
964 染色した切片は、脱水と脱パラフィン後に封入剤 (Entellan new、メルク & カンパニー、米
965 国) とカバーガラスで封入した。

966

967 性転換個体の精子の性状評価と人工授精による交配試験による F1 世代の性判 968 定

969 性転換が見られた Hd-rIII 系統を用いて精子の運動能評価と交配試験を行った。精子は、
970 氷冷麻酔をかけた性転換オスと正常オスから得た。得られた精子は、血球計数盤 (Burker-
971 Turk ; Sigma-Aldrich Co. LLC, USA) にて計数した。成熟した性転換魚 (HdrR-III) と通常の

972 ヒメダカのメスを 26°Cかつ明期が 12 時間となる条件で別々に飼育し人工授精に用いた。精
973 子は性転換魚から腹部圧出により得た。未受精卵は氷冷麻酔をかけたメスから得た。それら
974 の未受精卵と精子を、人工岩松精漿 (pH7.3) を添加した 6 ウェル培養プレート中で混合し
975 た。得られた受精卵を 26°Cで飼育し、孵化から 2 ヶ月間飼育した。得られた F1 個体の遺伝
976 子型および表現型性を上記の方法で決定した。

977

978 生殖細胞数の測定と性転換時期の推定

979 生殖細胞数の計測には、d-rR-olvas-GFP 系統を使用した。同じ親から採卵した個体を白色
980 試験区と緑色試験区に分配し 0 dph と 3 dph でサンプリングを行い蛍光顕微鏡下で観察し
981 た。サンプリングした個体は、スライドガラスにビニールテープで囲いを作りカバーガラス
982 で挟むようにし、3 回の計数の平均細胞数を使用した (3 回の計測が出来なかった個体につ
983 いては 2 回の平均値を用いた)。

984

985 緑色光照射下での生残率の推定

986 生殖細胞数によって、推定された性転換時期から性分化終了初期までの 5 dph、10 dph、
987 15 dph の生残率を測定した。

988

989 性分化期の個体を用いたコルチゾルアッセイ

990 コルチゾルアッセイには ELISA キット (Cortisol ELISA Kit、Cayman Chemical、米国) を
991 使用し、付属の説明書を参考にして実験を行った。メダカからのコルチゾル抽出方法は
992 Hattori et al.,⁸⁴³²の方法を参照した。サンプリングしたサンプルを PBS (PBS, pH 7.4、サーモ
993 フィッシャーサイエンティフィック株式会社、アメリカ合衆国) 250 µl とビーズの入ったチ
994 ューブに入れ、約 5 分間ホモジナイザーで粉碎した。その後、ガラス管に粉碎したサンプル
995 を入れ、250 µl の PBS で洗浄を 2 度繰り返し、チューブ内に残渣が残らないようにした。
996 その後、エーテル 1 ml を加え、30 分間転倒混合を行い、4°C、10,000g で 3 分間遠心分離し
997 た後、-80°Cにて 15 分以上冷却させ、エーテルを回収した。このエーテルによる混合・遠心・
998 冷却の抽出作業は 3 回以上繰り返した。抽出したエーテルは窒素ガスを吹き付け、揮発さ
999 せ、キット付属の ELISA Buffer 500 µl で希釈した。その後、得られた 500µl の溶液の内 50µl
1000 を ELISA プレートに供した。その後の、吸光度測定方法は、キットのプロトコールに沿っ
1001 て測定を行った。

1002

1003 統計処理

1004 性転換魚の出現率と F1 個体の性比についてはフィッシャーの正確確率検定を用いた。精
1005 子数の比較には T 検定を用いた。全てのデータを統計解析ソフトウェア Stat View 5.0 (SAS
1006 Institute Inc. NC, USA)を用いて解析した。

1007

結果

1008

1009

1010 オプシン遺伝子の発現について

1011 成魚では8種類のオプシン遺伝子が全て発現していたのに対し、孵化後3日齢の個体で

1012 は、6種類のオプシン遺伝子のみが目に発現していた (Fig 3-1 B)。また、紫外線オプシ

1013 ン遺伝子 (SWS1)、3種類の緑色オプシン遺伝子 (RH2-A/RH2-B/RH2-C) の全て、及び

1014 2種類の赤色オプシン遺伝子 (LWS-A/LWS-B) の全てが、孵化後3日齢の個体で発現し

1015 ていた。一方、2種類の青色オプシン遺伝子 (SWS2-A/SWS2-B) は、孵化後3日齢の個

1016 体では発現していなかった。

1017

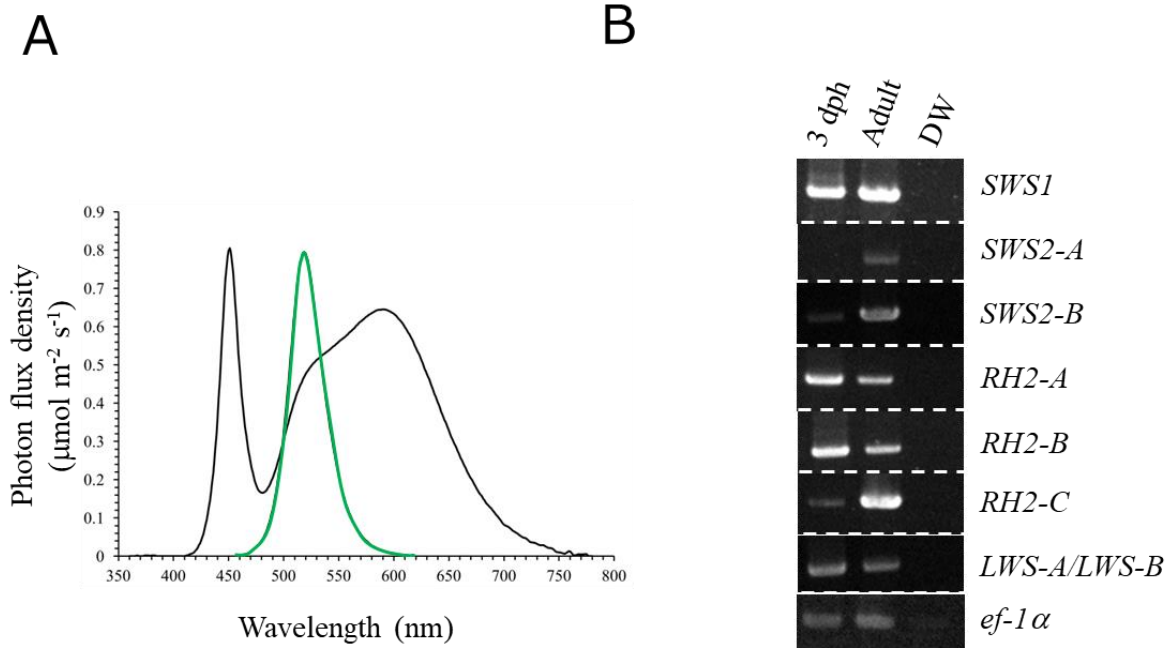
1018

1019

1020

1021

1022



1023

1024 Fig.3. 1

1025 Rearing conditions and opsin gene expression of newly hatched medaka. A White LED shows two
 1026 peaks at 451 and 581 nm. Green LED shows one peak at 518 nm. B RT-PCR analysis of 8 opsin genes
 1027 and *ef-1α* in the eyes of 3 dph and adult medaka.

1028

1029

1030

1031

1032

1033

1034

1035

1036

1037

1038

1039

1040

1041

1042

1043

1044

1045 遺伝的な性と表現型の性の不一致率

1046 Hd-rR111 系統

1047 実験魚は、各色 LED 照射処理で、60 日齢まで高い生残率（80%以上）を示した。白色お
1048 よび緑色 LED 照射群のいずれでも、緋色の体色の個体では *dmy* および *dmrt1* 遺伝子が検出
1049 され、白色の体色の個体ではゲノム PCR により *dmrt1* 遺伝子のみが検出された（Fig.3.2A,
1050 B）。したがって、緑色 LED 照射下で飼育した場合でも体色を指標とした遺伝的な性と性決
1051 定遺伝子を指標とした遺伝的な性が一致することが示された。

1052 白色 LED 試験区では、すべての遺伝子的オス（*dmy*^{+/+}, 緋色）で、精巢の形成、オスの二
1053 次性徴である背鰭の切れ込み、ならびに臀鰭の伸長が見られた（Fig.3.2D, G, J）。すべての
1054 遺伝子的メス（*dmy*^{-/-}, 白色）で、卵巣の形成、メスの二次性徴である背鰭に切れ込みが入ら
1055 ない、ならびに臀鰭が丸みを帯びている（Fig.3.2C, F, I）。緑色 LED 試験区では、すべての
1056 遺伝子的オス（*dmy*^{+/+}, 緋色）で、精巢の形成、オスの二次性徴である背鰭の切れ込み、なら
1057 びに臀鰭の伸長が見られた（n=40）。一方、白色の体色でありながらオスの二次性徴を示す
1058 個体が確認された。その個体では、平行四辺形の臀鰭と切れ込みが入った背鰭を有しており
1059 （Fig.3.2E）、*dmy* が検出されなかった。このような、遺伝的にメスでありながらオス型の二
1060 次性徴を示す個体が 15.9%出現した（*dmy*^{-/-}, 白色, n=7）。また、これらの魚は精巢を有して
1061 いた（Fig.3.2H, K）。一方、他の 84.1%の遺伝的なメス（n=37）は、メス特有の二次性徴を
1062 示し、卵巣を有していた。この結果、緑色 LED 試験区では、白色 LED 試験区に比べて遺伝

1063 的な性と表現型の性が不一致となる個体の出現率が有意に高かった（フィッシャーの正確
1064 確率検定、 $p < 0.05$ ）。白色 LED 試験区の全ての個体（ $n = 38$ ）で性転換魚は観察されなかつ
1065 た。

1066

1067

1068

1069

1070

1071

1072

1073

1074

1075

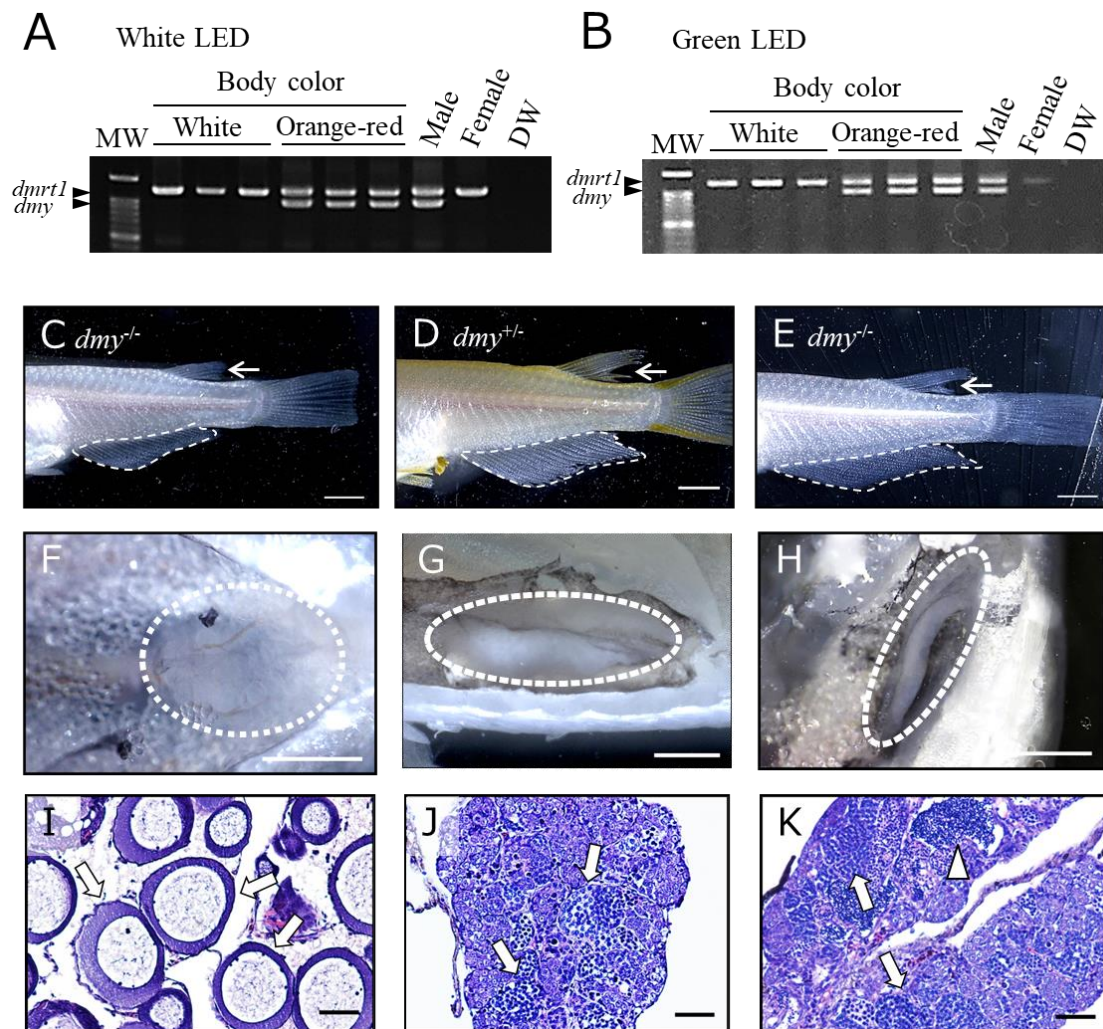
1076

1077

1078

1079

1080



1081

1082

Fig.3. 2

1083

1084

1085

1086

1087

1088

1089

1090

1091

1092

1093

1094

Determination of genotypic and phenotypic sex by body color, genomic DNA PCR, and the secondary sexual characteristics of dorsal and anal fins. (A, B) Genotypes of white and orange-red body color of 60-dph Hd-rRII1 medaka reared under white LED (A) and green LED (B). A primer set designed for the conserved region of *dmy*, a sex determination gene on the Y chromosome, and *dmrt1*, an orthologue of *dmy* located on an autosome, were used for PCR analysis. Fin clips of adult males and females were used as positive controls. DW; distilled water for negative control. MW; molecular weight marker. (C) Genotypic female (white body color) showing female-specific fin types under green LED irradiation. An uncut dorsal fin (arrow) and a round-shaped anal fin (dotted line) are secondary sexual characteristics of females. (D) Genotypic male (orange-red body color) showing male-specific fin types under green LED irradiation. A deeply cut dorsal fin (arrow) and a parallelogram-shaped anal fin (dotted line) are secondary

1095 characteristics of males. (E) Genotypic female (white body color) showing secondary
1096 characteristics of males, i.e. a deeply cut dorsal fin (arrow) and a parallelogram-shaped
1097 anal fin (dotted line). (F–H) External observation of the gonads of green LED-irradiated
1098 medaka (C–E). Dotted lines show ovary (F) and testes (G, H). (I–K) Histological
1099 observation of gonads of green LED-treated medaka (C–E). Perinucleolar oocytes
1100 (arrows in I) in ovaries and spermatogenic cells (arrows in J) were observed.
1101 Spermatogenic cells (arrows) including spermatozoa (arrowheads) were observed in
1102 female-to-male sex-reversed medaka testes (K). Scale bars=2mm (C–H), 40 μ m (I–K).

1103

1104

1105

1106

1107

1108

1109

1110

1111

1112

1113

1114

1115

1116

1117 **d-rR-olvas-GFP 系統**

1118 d-rR-olvas-GFP 系統でも体色と *dmy* 遺伝子の有無は一致した。また、白色緑色光試験区共
1119 に遺伝的オスでは精巢を有する個体のみ出現した。一方、遺伝的メスで精巢を持つ個体は白
1120 色試験区で 50.0% (5/10 個体) であり、緑色試験区で 81.8% (9/11 個体) と両試験区で高い
1121 性転換が観察された。

1122

1123

1124

1125

1126

1127

1128

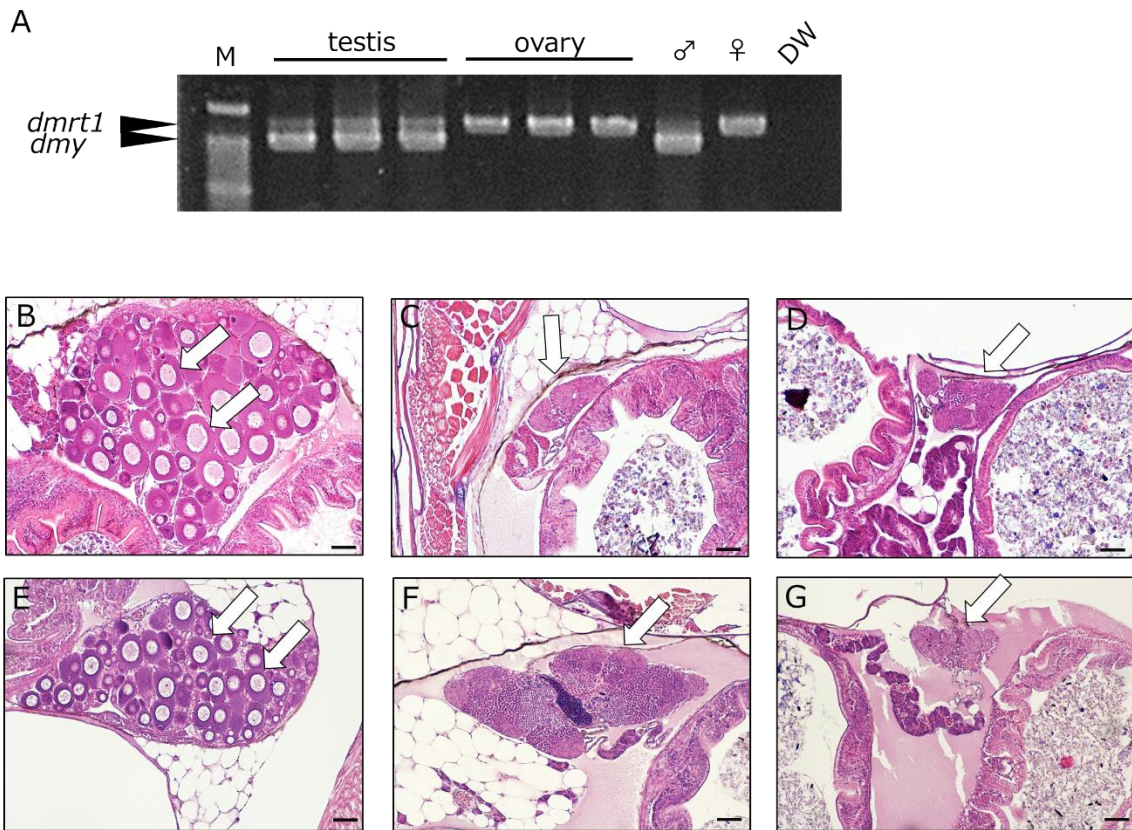
1129

1130

1131

1132

1133



1134

1135 Fig.3. 3

1136 Determination of genotypic and phenotypic sex by genomic DNA PCR and gonadal
 1137 histology. (A) A primer set was as same as previous experiment. Fin clips of adult males
 1138 and females were used as positive controls. DW; distilled water for negative control. MW;
 1139 molecular weight marker. B, C, D (White light) E, F, G (Green light). Genetic sex and
 1140 phenotypic sex matched gonadal histology results in both groups. However, some genetic
 1141 female has testis in each treatment's receptivity (D, G). Arrow head showed gonad.

1142

1143

1144

1145

1146

1147 ヒメダカ

1148 Hd-rRII1 系統と同じ条件で飼育した個体を解析した。ヒメダカの場合体色による遺伝的な
1149 性判別はできないので、遺伝的な性はゲノム PCR による *dmy* の有無で判定し、表現型の性
1150 は、生殖腺の組織切片を作成して雌雄判別を行った。白色 LED 試験区では、遺伝的な雌 (*dmy*^{-/-})
1151 で卵巣を有する個体が 100%出現した (n=25/25)。また、緑色 LED 試験区でも、遺伝的
1152 な雌 (*dmy*^{-/-}) で卵巣を有する個体が 100%出現した (n=16/16)。ヒメダカ系統では、遺伝的
1153 な性と表現型の性が不一致となる個体は全ての試験区で出現しなかった (データ省略)。

1154

1155

1156

1157

1158

1159

1160

1161

1162

1163

1164

1165 遺伝的な性と表現型の性が不一致となった個体の配偶子の機能試験

1166 性転換オス ($dmy^{-/-}$, 白色, オス型の二次性徴) ($n = 2$) から精子を得た。得られた精子に
1167 は、正常なオスの精子と形態的な差は見られなかった (Fig.3. 4A)。ゲノム PCR 解析の結果、
1168 性転換オスの精子とヒレから dmy 遺伝子は検出されなかった (Fig.3. 4B)。性転換したオス
1169 が性行動を示すかどうかを調べるために、各オス ($n = 2$) を正常なメス ($n = 7$) とペアに
1170 し、1 ヶ月間飼育した。しかし、性行動や産卵は観察されなかった。そこで、性転換オス ($dmy^{-/-}$)
1171 から得られた精子と正常メス ($dmy^{+/+}$) から採取した未受精卵を用いて人工授精試験を行
1172 った。ゲノム PCR 解析の結果、解析した F1 個体 ($n = 18$) はいずれも dmy が検出されな
1173 かった (Fig.3. 4C)。孵化後 2 ヶ月の F1 個体 ($n = 18$) の生殖腺の組織切片を作成し、観察
1174 したところ、全ての個体で卵巣を有することを確認した (Fig.3. 4D)。

1175

1176

1177

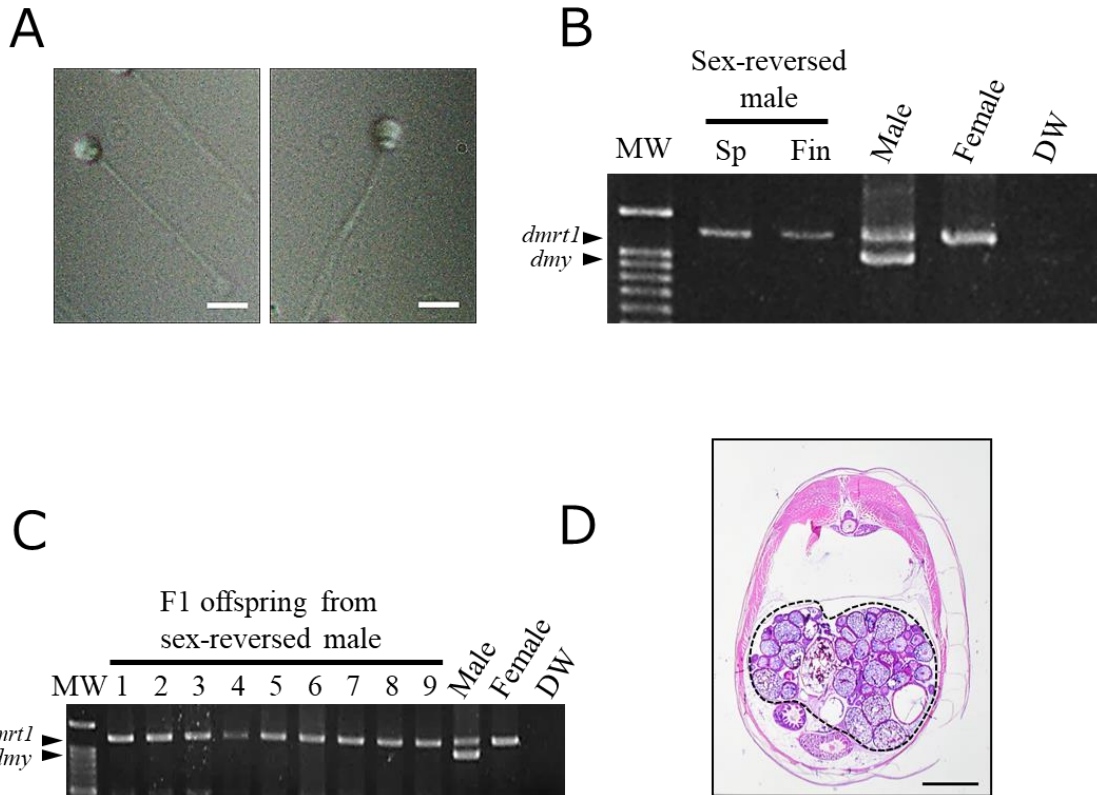
1178

1179

1180

1181

1182



1183

1184 Fig.3. 4

1185 Figure 3. Progeny test of sperm obtained from sex-reversed males. (A) A sex-reversed
 1186 male showing a female genotype ($dmy^{-/-}$), female-specific white body color, and male-
 1187 specific secondary sexual characteristics in fins (a parallelogram dorsal fin and a deeply
 1188 cut anal fin, arrows). (B) Spermatozoa obtained from a sex-reversed male (lef) were
 1189 morphologically normal and indistinguishable from those of a normal male (right). (C)
 1190 Density of spermatozoa of normal males (n=3) and a sex-reversed male (n=2). $P < 0.05$.
 1191 (D) Genomic DNA PCR of the sperm (Sp) and a fin (Fin) of a sex-reversed male using a
 1192 primer set for $dmy/dmrt1$ genes. (E) Genomic DNA PCR for F1 offspring obtained from
 1193 sex-reversed males (n=2) (lanes 1–9) using a primer set for $dmy/dmrt1$ genes. Fin clips
 1194 of adult males and females were used for positive controls. DW, distilled water for
 1195 negative control; MW, molecular weight marker. (F) Histological observation of a gonad
 1196 of F1 offspring. Dotted line shows an ovary. Scale bars=2mm (A), 10mm (B), 0.5mm (F).

1197

1198

1199

1200 生殖細胞数に基づく性転換時期の推定

1201 d-rR-olvas-Tg 系統を用いた試験では、全ての試験区で腹腔背壁の位置に EGFP フィルター

1202 下で蛍光を発する細胞があることを確認した。0 dph の生殖細胞数は、白色光試験区の遺伝

1203 的オスで 71 ± 17.9 個/尾で、遺伝的メスでは 95 ± 31.0 個/尾であった。緑色光試験区の遺伝的

1204 メスでは 92 ± 26.2 個/尾であった。これらの試験区間の生殖細胞数に有意な差は見られなか

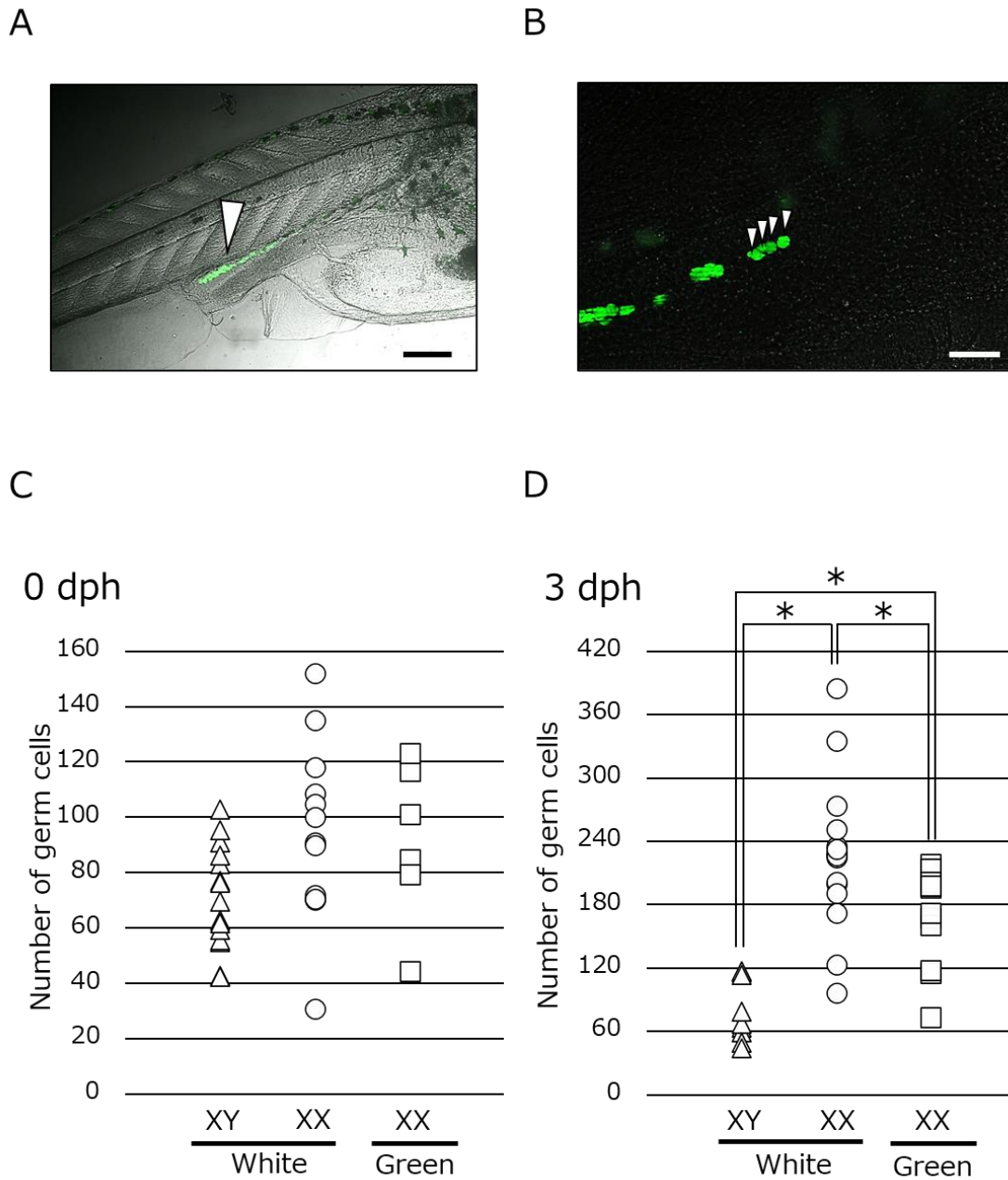
1205 った。一方、3 dph での生殖細胞数は、白色光試験区の遺伝的オスで 79 ± 17.9 個/尾で、遺伝

1206 的メスでは 226 ± 67.6 個/尾であった。緑色光試験区の遺伝的メスでは 167 ± 44.5 個/尾であっ

1207 た。白色試験区の遺伝的なオスとメスの間で生殖細胞数に有意な差が見られた。また、緑色

1208 光試験区の遺伝的なメスが有する生殖細胞は、白色光試験区の遺伝的なメスに対して有意

1209 に低い生殖細胞数であった。



1210

1211 Fig.3. 5

1212 A GFP fluorescent germ cells in transgenic medaka by fluorescence microscope. B is a
 1213 partial expanded view in B. C Germ cell number under white and green light condition.
 1214 There was no significant difference all groups. D The germ cell number was significant
 1215 different between genetic male and genetic female. Moreover, genetic female under green
 1216 light fish showed significantly lower than genetic female with white light. Arrow head
 1217 showed germ cell in A and B. XY/XX showed genetic sex.

1218 生残率と性分化期のコルチゾルについて

1219 各試験区における性分化時期のコルチゾル濃度を示した (Fig.3.7)。5 dph では、白色光試
1220 験区のコルチゾル濃度は 12.97 ± 6.36 pg/fish で緑色光試験区のコルチゾル濃度は 18.89 ± 7.23
1221 pg/fish であった。これらコルチゾル濃度は、白色光試験区と緑色光試験区間に有意な差は見
1222 られなかった。1 時間の干出を行った High-stress 試験区の個体は、 55.15 ± 22.46 pg/fish で、
1223 他の試験区に対して有意に高いコルチゾル濃度が見られた (Scheffe の多重比較検定、白色
1224 光 : $p < 0.01$ 、緑色光 : $p < 0.05$)。10 dph では、白色光試験区のコルチゾル濃度は $24.76 \pm$
1225 6.28 pg/fish で緑色光試験区のコルチゾルは 9.37 ± 1.05 pg/fish であった (Mann-Whitney の U
1226 検定、 $p > 0.05$)。白色光試験区と緑色光試験区間に有意な差がみられ、白色光試験区に対し
1227 て緑色試験区が低い値を示した。15 dph の試験区では、白色光試験区のコルチゾル濃度は
1228 27.21 ± 15.75 pg/fish で緑色光試験区のコルチゾルは 33.47 ± 16.68 pg/fish であった。両試験区間
1229 に有意な差は見られなかった。

1230

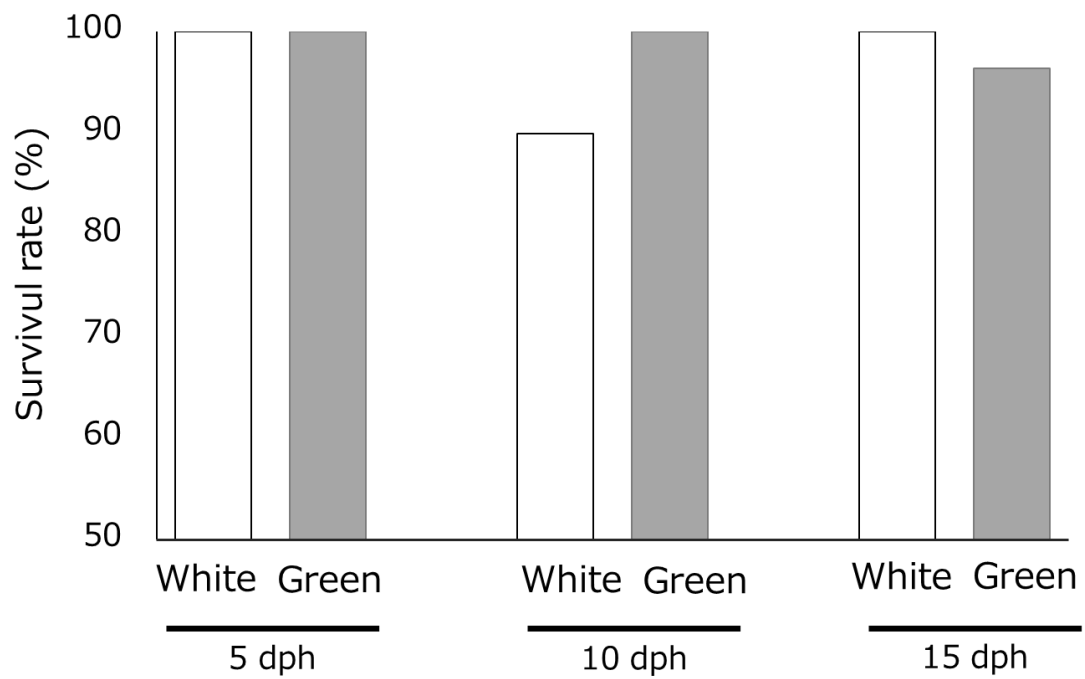
1231

1232

1233

1234

1235



1236

1237 Fig.3. 6

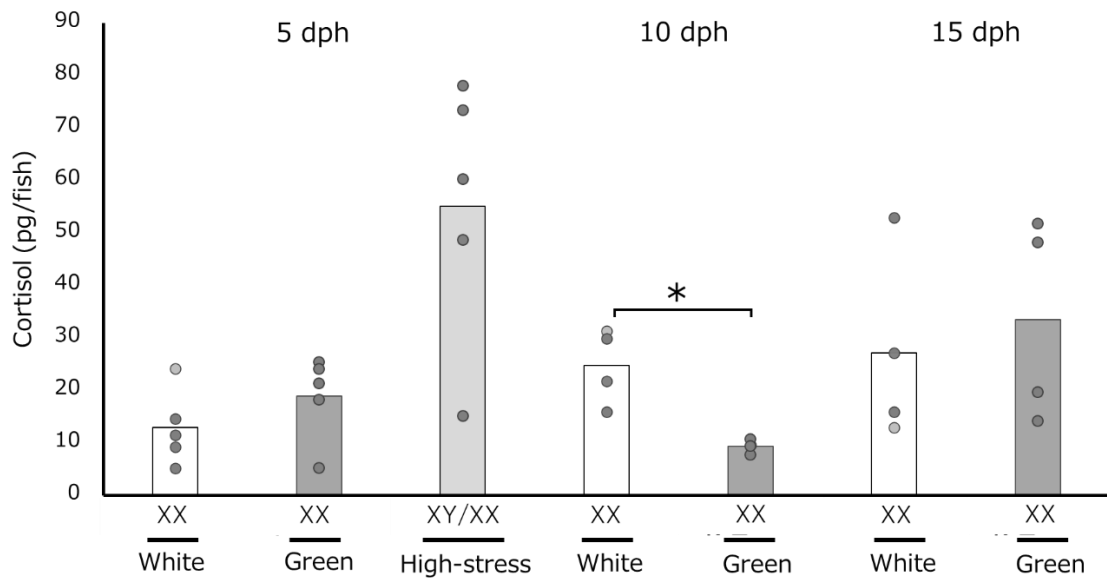
1238 All groups showed high survival rate respectively (over 80 %).

1239

1240

1241

1242



1243

1244 Fig.3. 7

1245 Whole body cortisol level under white and green light condition.

1246 High-stress treatment was significantly higher than white and green light treatments in 5

1247 dph. Green light groups showed significantly lower than white light groups in 10 dph.

1248 There was no significant different both groups in 15 dph. XX showed genetic sex.

1249

1250

1251

1252

1253

1254

1255

1256

1257

考察

1258

1259

1260 本研究では、性分化期に緑色 LED 光を照射することで、遺伝的メスから表現型がオスへ

1261 性転換が誘導され、さらに性転換が誘導された個体（性転換オス）は生殖可能な精子を生産

1262 することを示した。メダカへの緑色光照射によってメスからオスへの性転換が起こるメカ

1263 ニズムについては、本研究では明らかにできなかった。一つの可能性として、特定の波長の

1264 照射による細胞死の影響で性転換が誘導されたことが考えられる。昆虫では、ショウジョウ

1265 バエ (*Drosophila melanogaster*)、イエカ (*Culex pipiens molestus*)、ヒラタコクヌモドキ

1266 (*Tribolium confusum*)、イチゴハムシ (*Galerucella grisea*) は、可視光域の青色光の照射

1267 によって個体そのものの死を誘導する。これらの研究では、青色光の照射は活性酸素種 (ROS)

1268 を産生し、細胞死を誘導することが示唆されている^{85,86}。メダカの正常な生殖腺発生におい

1269 て、遺伝的メスは遺伝的オスの 5 倍の生殖細胞を孵化後 10 日齢で保有している。RNA ノッ

1270 クダウンによる生殖細胞数の抑制実験では、メダカの生殖細胞数を抑制することで遺伝的

1271 メスでありながら精巣を有する性転換が誘導される個体が観察されたことが報告されてい

1272 る^{87,88}。このことは、性分化初期の生殖細胞数がメダカの表現型の性を決める重要な要因で

1273 あることを示唆している。したがって、特定の光波長照射が ROS の発生を誘導し、性分化

1274 初期の生殖細胞の分裂を抑制、または、アポトーシスを誘導することで性転換が起きた可能

1275 性がある。

1276 従来から知られている高水温暴露による性転換メカニズムは、ストレス指標の一つであ
1277 るコルチゾルの系が関与していることが報告されている^{81,89}。既に、多くの文献にて、性分
1278 化期の高水温暴露がメダカをメスからオスへ性転換させることが報告されている^{22,79,81,90,91}。
1279 過去の研究では、性分化期に高水温に暴露することでコルチゾルレベルが上昇し、コルチゾ
1280 ルが *cyp19a1a* のプロモーター領域にバインドすることで、*cyp19a1a* の発現を抑制し、性転
1281 換を誘導することが報告されている⁸⁹。このように、グルココルチコイドの過剰生産は、ア
1282 ンドロゲンを変換する重要な酵素である P450 アロマターゼをコードする
1283 *cyp19a1a* を抑制すると考えられている。近年、このコルチゾルによる性転換機構の上流機
1284 構に関しても解析が進み、高水温暴露により視床下部で *crhb* の発現が上昇し、脳下垂体に
1285 分布する *crhr1* と *crhr2* の発現が上昇することで ACTH を介したコルチゾルの分泌を促進さ
1286 せ生殖腺において *gsdf* の発現の上昇と *cyp19a1a* の発現を抑制することでメスからオスへの
1287 性転換が誘導されることを報告している⁹²。本実験では、性分化期のメダカのコルチゾル測
1288 定を行い、白色光試験区と緑色光試験区の間では、差がないか緑色光試験区の方が低いこと
1289 を示した。Hayasashi et al.⁸¹ では、高水温による性転換時のコルチゾルレベルを示しており、
1290 0 dph の個体では、遺伝的メスかつ 33°C 飼育で約 30-35 pg/fish であること報告した。
1291 Castañeda-Cortés et al.⁹² では、遺伝的メスで *cas9* のみをインジェクションした個体を 32°C
1292 で飼育し stage32 の個体を用いてコルチゾルレベルを測定したところ 40 pg/fish であったこ
1293 とを報告している。今回の研究では、各試験区共に先行研究で性転換が誘導された時のコル

1294 チゾル濃度で 30pg/fish を上回る個体は出現しなかった。高水温暴露によるコルチゾルを
1295 介した性転換誘導では、コルチゾルの下流に脂肪酸代謝に関連する因子が関係しているこ
1296 とが報告されている⁹³。また、マウスを用いた実験では、特定の光波長照射が脂質代謝を変
1297 化させることが報告されている⁹⁴。これらの報告より、特定の光波長照射による性転換誘導
1298 は、コルチゾルを介さず脂質代謝を攪乱し性転換が誘導された可能性がある。

1299 第2章で、網膜電図解析により網膜の視覚特性について明らかにしたが、その一方で光受
1300 容体は網膜だけでなく、メダカの松果体や深部脳にも存在している⁹⁵。サクラマス
1301 (*Oncorhynchus masou*) では、深部脳に位置する血管嚢がロドプシンファミリー遺伝子 *RHL*、
1302 *SWS1*、*LWS*、*OPN4* を発現し、生殖腺の発達を制御していることが知られている⁷³。クラゲ
1303 の *Clytia gregaria* では、オプシン9として知られる光受容タンパク質が生殖腺の発達を制御
1304 していることが明らかにされている⁹⁶。このことから、既知あるいは未知の光受容体が魚類
1305 の性分化に影響を与えている可能性があると考えられる。今後は、どの光受容器官が性転換
1306 を誘導したかを明らかにする必要がある。

1307 本研究で性転換が見られたのは、Hd-rRIII 系統と d-rR-olvas-GFP 系統であり、市販のヒメ
1308 ダカでは性転換が見られなかった。一般的な野生個体における、メダカの性転換率は、日本
1309 (北方個体群と南方個体群)、中国、西・東朝鮮で 0.98%程度であると報告されており⁹⁷、
1310 本研究で得られた緑色光試験区の Hd-rRIII 系統の性転換率 (15.9%) と d-rR-olvas-GFP 系統
1311 の性転換率 (81.8%) は、野生個体群で観察される性転換率よりも高かった。一方で d-rR-

1312 olvas-GFP 系統では、他の 2 系統に比べて、高い性転換率を示した。この性転換率の違いは、
1313 系統によるものであると考えられる。高水温暴露による性転換誘導実験では、系統間での性
1314 転換率は異なることが報告されている。例えば、Sato et al.²²では、Hd-rRIII 系統と HNI 系
1315 統を 27°C と 32°C の高水温下で飼育を行い性転換率を比較した。その結果、32°C 試験区で
1316 は、HNI 系統で 50%、Hd-rRIII 系統で 24%の性転換が起こったことを報告した。27°C 試験
1317 区では、Hd-rRIII 系統で性転換が起こらなかったが HNI 系統では 11%の割合で性転換が誘
1318 導された。その後の実験では、温度依存的に性転換が誘導されることが報告されている^{91,98}。
1319 興味深いことに、Hattori et al.⁹¹では、Hd-rRIII 系統を 25°C で飼育した際に性転換率は 0%
1320 であることを報告しているが、Adolfi et al.⁹⁸では、同じ 25°C で飼育した Hd-rRIII 系統の性
1321 転換率は 61.3%であることを報告した。HNI 系統に関しても、Aolfi et al.⁹⁸は、25°C 下の飼
1322 育で 46.7%の割合で性転換が誘導されたことを報告しているが、一方で Castañeda-Cortés et
1323 al.⁹⁹では、同じ HNI 系統を 24°C で飼育した際の性転換率は 0%であり、32°C の飼育で 52.4%
1324 であると報告した。これらの例の様に、たとえ同じ系統でも環境要因に対する応答が大きく
1325 異なることや、性転換率が 100%とならないことから個体間の環境要因に対する応答の違い
1326 が性転換に反映された可能性を示している。本実験では、波長については 518 nm かつ任意
1327 の光強度しか用いなかったため、本研究で検討できていない光波長や光強度の違いが性転
1328 換率に寄与する可能性は非常に高い。

1329 多くの養殖魚では、性別によって成長に差がでることや精巣や卵巣に価値があり、それに

1330 よって市場価値が異なることが知られている。例えば、ヒラメやコイチ (*Nibea albiflora*) の

1331 メスはオスよりも成長が早い⁵⁹。チョウザメ科魚類では、魚卵 (キャビア) が高い価値を持

1332 っている³⁴。したがって、魚種によっては、商業的な利益を考慮すると、性統御、すなわち

1333 メスまたは、オスの単一性生産が望ましい。雌雄異体魚の場合、メチルテストステロンを投

1334 与することによってメスからオスへの性転換が誘導でき、作出した性転換オスを正常なメ

1335 スと交配させることで次世代が全メスとなる単一性生産が可能になる¹⁰⁰⁻¹⁰²。従来性の統御

1336 技術は、性ホルモンで処理した飼料を与えることで、性的に未分化な個体を性転換させる。

1337 そして、性転換魚が生産する配偶子を利用して次世代を全メス化させる。しかし、性ホルモ

1338 ンの過剰投与は、不妊や生殖腺の異常発達を引き起こす可能性がある。さらに、商業的には

1339 性ホルモン投与による性転換誘導の安全性については、消費者の安全性への懸念や、環境中

1340 への流出の影響が心配されている。特定の波長の光を照射することで、他の養殖対象種でも

1341 偽オスを誘導することができれば、性ホルモンを使用するよりも安全でコストのかからな

1342 い新たな性操作システムの確立が期待できる。

1343

1344

1345

1346

1347

1348 第4章 特定の光波長照射による水産有用魚を用いた

1349 性転換誘導試験

1351 背景

1352

1353 近年世界規模で養殖生産量は増加傾向にあり、効率の良い養殖技術の開発が求められて

1354 いる¹。魚類養殖の高効率化を図る上で、魚類の性は養殖効率や付加価値化を左右する重要

1355 な要因である。多くの魚類でオス、または、メスによって成長率が異なることや、精巣か卵

1356 巣を持つことで、市場価値が異なることが知られている。例えば、トラフグでは精巣に価値

1357 があるためオスの市場価値が高い¹⁵。一方、チョウザメでは魚卵に価値があるためメスの市

1358 場価値が高い³。これらの例の様な魚類の性を人為的に制御出来れば、養殖の収益性が高ま

1359 る。前章で近交系メダカを用いた光照射試験の結果、遺伝的なメスでありながら精巣を有す

1360 る個体が出現した。また、この性転換個体は機能的な配偶子を生産することが交配試験の結

1361 果から明らかとなった。そこで、水産有用魚種を用いて特定の光波長照射による性転換が誘

1362 導されるか検討を行った。この実験では、遺伝的な性と表現型の性が不一致となる個体を発

1363 見することが重要である。したがって、遺伝的な性が判別できる魚種を使用する必要がある。

1364 魚類の性決定遺伝子は、メダカ、パタゴニアペヘレイ、トラフグ等のいくつかの魚種で報告

1365 されている^{12,14,15}。しかし、哺乳類の性決定遺伝子のように多くの種類で同じ性決定遺伝子

1366 が使用されているわけではない¹⁰³。また、本実験の目的として養殖対象魚種を用いる必要
1367 がある。

1368 ナイルティラピアは、多くの国で養殖されている極めて重要な水産有用魚種であり、古く
1369 から全メス、全オス種苗生産が行われてきた¹⁰⁴。これらの性統御は主に、性ホルモン投与
1370 による性転換誘導を介した性統御手法であり広く普及している。また、マスター性決定遺伝
1371 子は、不明であるが性マーカーについては多くの報告があり¹⁰⁵、遺伝的な性のマーカーと
1372 表現型の性が一致するかは系統によって異なることが既に報告されている¹⁰⁵。Li et al.¹⁰⁵で
1373 報告された Y 染色体上の *amhΔY* をコードする領域に作成された性マーカーが、アフリカの
1374 湖で採集された野生個体でも使用できることが 2020 年に報告された¹⁰⁶。これらのことから、
1375 本実験ではナイルティラピアを供試魚として用い先行研究で報告された性マーカーが
1376 使用できるか検討したのち、光照射試験を行い遺伝的な性と表現型の性が不一致となる個
1377 体が出現するか試みた。

1378

1379

1380

1381

1382

1383

材料と方法

1384

1385

1386 供試魚

1387 鹿児島県指宿市の木村養魚場より分与されたナイルティラピアを用いた。受精卵より特

1388 定の光波長を照射して飼育を行うために人工授精による採卵を行った。飼育水温は 28°C で

1389 維持し、電気伝導率を 50 S/m となるようにした。全ての個体を個別飼育 (60 cm 循環水槽)

1390 し、底面に市販の荒磯砂を 5 cm ほど敷いて飼育を行った。正午に生殖突起が顕著に出てい

1391 る個体を夕方に MS-222 で麻酔し、腹部を圧出して未受精卵を得た。得られた未受精卵を岩

1392 松の人工授精用バッファーに浸し、オスの腹部を圧出して精子を絞り混合したのち、水道水

1393 を加え 3 分ほど静置した。その後、循環水槽にて受精卵を攪拌して、翌日より各光波長の試

1394 験区に受精卵を分配した。

1395

1396 飼育条件

1397 試験区には、白色光、青色光、緑色光、赤色光の 4 試験区を用意した。それぞれ、450 nm、

1398 470 nm、518 nm、670 nm にピークを持つ光源を使用した (LDA6-G and LB1526G、株式会社

1399 ビームテック、日本)。光周期は、12 時間明期と 12 時間暗期の試験区と、24 時間照明試験

1400 区を設定した。光強度は分光高度計 (CL-500A、コニカミノルタ株式会社、東京、日本) で

1401 測定し、各試験区~PFD とした。12 時間の明暗周期の試験区では、受精から孵化後 28 日齢

1402 までは、小型のガラス水槽（31.5×18.5×24.4 cm）で飼育を行い、孵化後 29 日齢から 84 日齢
1403 までは、100L 縦長水槽（h 80.0 cm, D 50.0 cm）で飼育を行った。給餌は 1 日に 3 回行った。
1404 24 時間照明試験区では、ガラス水槽（31.5×18.5×24.4 cm）で 140 日間飼育し、水温 28°C、
1405 明期 24 時間とした。

1406

1407 性判別マーカー

1408 Li et al.¹⁰⁵で報告された Y 染色体の *amh ΔY* 上に設計されたプライマーを用いて、性判別
1409 が可能であるかゲノム PCR による遺伝的な性と生殖腺の外部形態による表現型の性が一致
1410 するかどうかによって判別した。また、ゲノム PCR によって得られた産物をダイレクトシ
1411 ーケンスにより配列を解析した。ゲノム PCR では、PCR 酵素（KOD ONE、東洋紡株式会
1412 社、大阪、日本）を用いて 98°C で 10 秒、57°C で 5 秒、68°C で 5 秒の工程を 40 サイク
1413 ル繰り返す条件で行った。得られた産物に DNA 蛍光染色試薬ミドリグリーン、NIPPON
1414 Genetics Co., Ltd) を混ぜ、1%アガロースゲルで泳動し、トランスイルミネーター上で目的
1415 の産物を切り出し、市販ゲノム抽出キット（Fast GeneTM ゲル/PCR 抽出キット、ニホンジェ
1416 ネティックス株式会社、日本）を用いて、アガロースゲルからゲノム DNA の抽出及び、PCR
1417 産物の精製を行った。精製された PCR 産物は、DNA シーケンスキット ??? キット (BigDye
1418 Direct Cycle sequencing Kit、サーモフィッシャーサイエンティフィック株式会社、アメリカ)
1419 を用いて、96°C で 3 分 96°C で 10 秒、50°C で 5 秒、60°C で 4 秒、の工程を、30 サイク

1420 ル繰り返す条件で PCR を行った。エタノール沈殿で PCR 産物を精製したのち、-20°C で 20
1421 分凍結し、-4°C、13,200 g、15 分の条件で遠心を行い上澄みを取り除き、70%エタノールで
1422 洗浄した後、風乾し、20 μ l の Hd-di ホルムアミドを、各サンプルに添加し 100°C で 3 分間
1423 沸騰させ氷冷したものをシーケンサーに供した。

1424

1425

1426

1427

1428

1429

1430

1431

1432

1433

1434

1435

1436

1437

1438 Table 2 PCR primer sets used for RT-PCR and genomic PCR.

gene name		5'-3'	Reference
<i>amh</i> Δ <i>Y</i> ₊₅	Forward	AAACCTCCTTCCTTTGTGAATGTC	Li et al., 2015
	Reverse	CTAGCGGCATCCACACTCCCTCAC	
<i>amh</i> Δ <i>Y</i> ₋₂₃₃	Forward	CGGTCCCAGTGACCTATGAG	Eshel et al., 2014
	Reverse	AAGTACACGTGGTGTATTGTAATTGA	
<i>actb</i>	Forward	CCTGACAGAGCGTGGCTACTC	Honda et al., 2020
	Reverse	TCTCTTTGATGTCACGCACGAT	

1439

1440

1441

1442

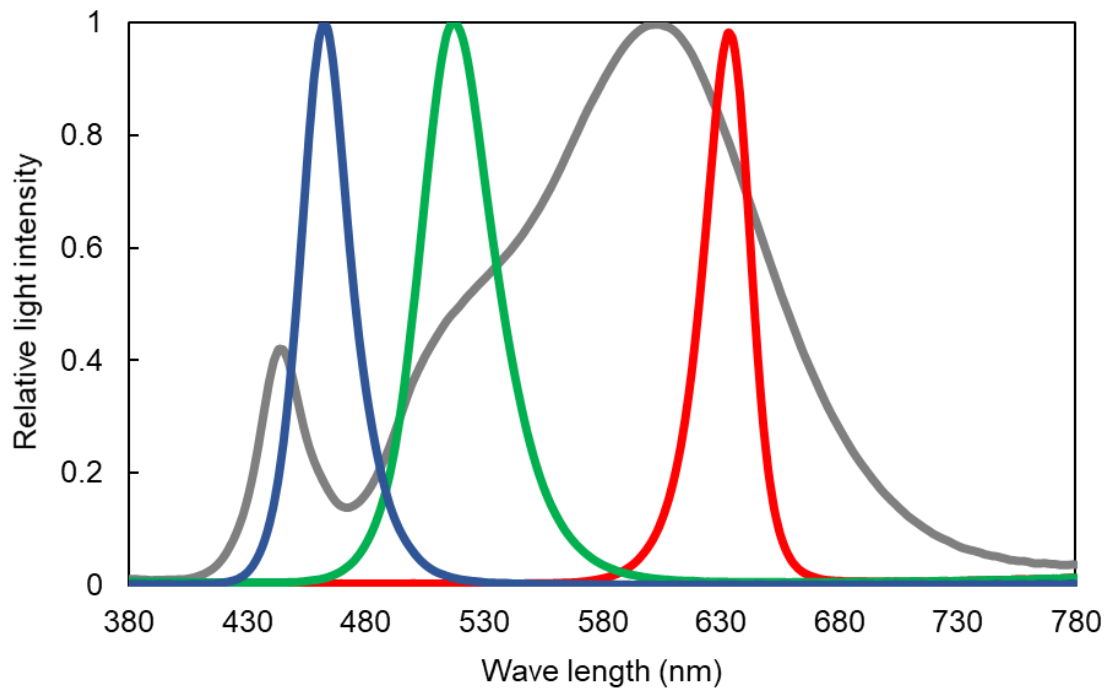
1443

1444

1445

1446

1447



1448

1449 Fig.4. 1

1450 The light peak showed 603 nm (White), 462 nm (Blue), 518 nm (Green), 633 nm (Red).

1451 White LED lamp was used natural LED light, which has continuous waveform.

1452

1453

1454

1455

1456

1457

1458

1459

1460

1461 **生殖腺組織切片**

1462 供試魚は、12 時間以上暗順応させた魚と名順応させた魚を用いた。魚体を Bouin 氏固定
1463 液に 4°C で 24 時間固定し、70%から 100%まで段階的に各 1 時間ずつエタノールによる脱
1464 水を行った。次に、キシレンに 1 時間浸漬させる工程を 3 回行った。得られたサンプルをパ
1465 ラフィンに包埋し、6 μm の厚さに薄切した。次に常法に従ってヘマトキシリン&エオシン
1466 染色を行い、カバーガラスで封入し、光学顕微鏡下で観察を行った。

1467

1468 **ゲノム PCR**

1469 Li et al.¹⁰⁵ で報告されたプライマーを用いて、遺伝的な性判別を行った (Table 2)。ゲノム
1470 DNA は、5 mm 各四方に切り出した鱭を cell lysis buffer 500 μl と ProteaseK 1 μl で溶解した
1471 後、13,200 g で 10 分間遠心しペレット化されたものを 70 %エタノールで洗浄し、風乾した
1472 のち滅菌済み DW で希釈した。PCR 酵素には、KOD ONE (東洋紡株式会社、大阪、日本)
1473 を用いて、98°C で 10 秒、57°C で 5 秒、68°C で 5 秒の工程を 30 サイクル繰り返す条件で
1474 PCR を行った。得られた PCR 産物は、アガロースゲルを用いて電気泳動を行いエチジウム
1475 ブロマイドで染色し、トランスイルミネーターで可視化した。

1476

1477

1478

結果

1479

1480

1481 性マーカーの一致

1482 表現型の性である精巣または、卵巣と Li et al.¹⁰⁵ で報告された遺伝的な性とリンクしてい

1483 る性マーカーが、本実験においても一致した (Fig.3.2 A,B)。また、ダイレクトシーケンス

1484 で得られた配列も報告されている配列と一致した (データ省略)。このことから、遺伝的な

1485 性を Li et al.¹⁰⁵ で報告された性マーカーを指標として遺伝的な性を決定し、表現型の性を生

1486 殖腺の組織切片観察を元にした精巣か卵巣であるかを元に決定した。

1487

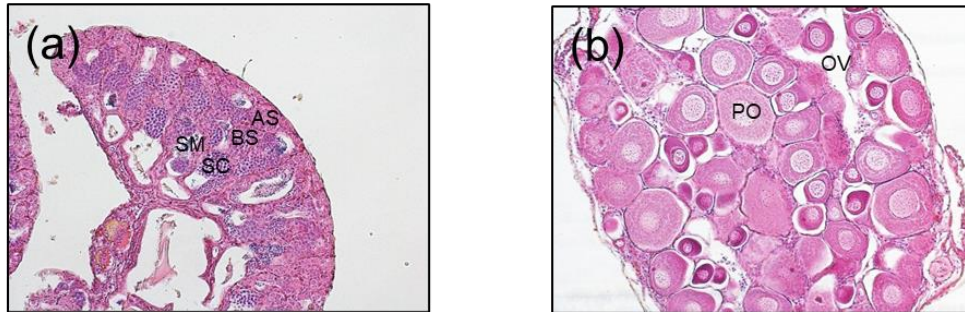
1488

1489

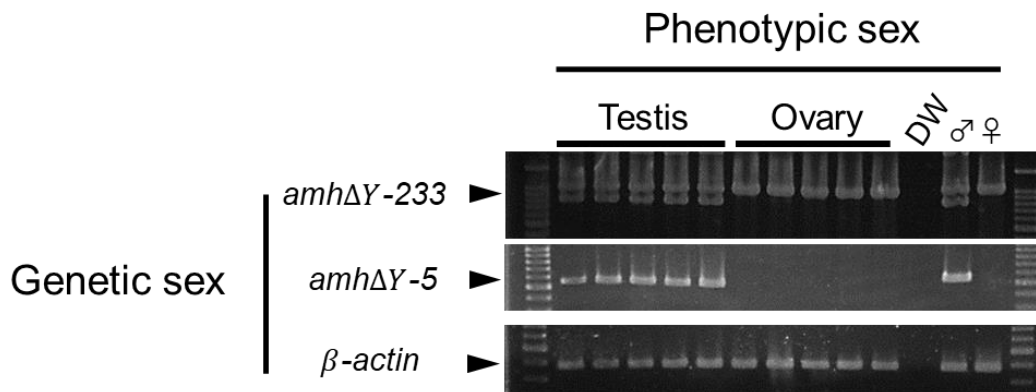
1490

1491

A



B



1492

1493 Fig.3. 2

1494 Phenotypic sex and genotypic sex were matched both sexes.

1495 A Gonadal histology of testis obtained from Nile tilapia. B Gonadal histology of ovary

1496 obtained from Nile tilapia. C Genomic PCR performed three kind of primer sets. The

1497 primer sets were cited Li et al., 2015. SM: spermatid SC: Spermatocyte BS: B-type

1498 spermatogonia AS: Type A spermatogonia PO: perinucleolus ovary OV: ovarian cavity

1499

1500

1501

1502

1503

1504 遺伝的な性と表現型の性の不一致率

1505 明期 12 時間 暗期 12 時間の試験区では、遺伝的な性と表現型の性は、全ての試験区で一
1506 致した。孵化後 88 日齢の個体の組織切片の図を示す (Fig.3.4A-H)。オスでは、A 型精原細
1507 胞、B 型精原細胞、精細胞までの生殖細胞が観察された (Fig.3.4A, C, E, G)。一方、メスで
1508 は、周辺時期の卵母細胞と卵巣腔が観察された (Fig.3.4B, D, F, H)。生殖腺内が空洞となる
1509 ような異常な生殖腺は観察されなかった。

1510 24 時間照明試験区では、各試験区で遺伝的なオスで卵巣を有する個体が出現した。白色
1511 24 時間試験区で 5.9% (Fig.3.5C)、赤色 24 時間試験区で 21.0% (Fig.3.5F)、緑色 24 時間試
1512 験区で 0%、青色 24 時間試験区で 21.1% (Fig.3.5K) の遺伝的なオスで卵巣を有する性転換個
1513 体が見られた。

1514

1515

1516

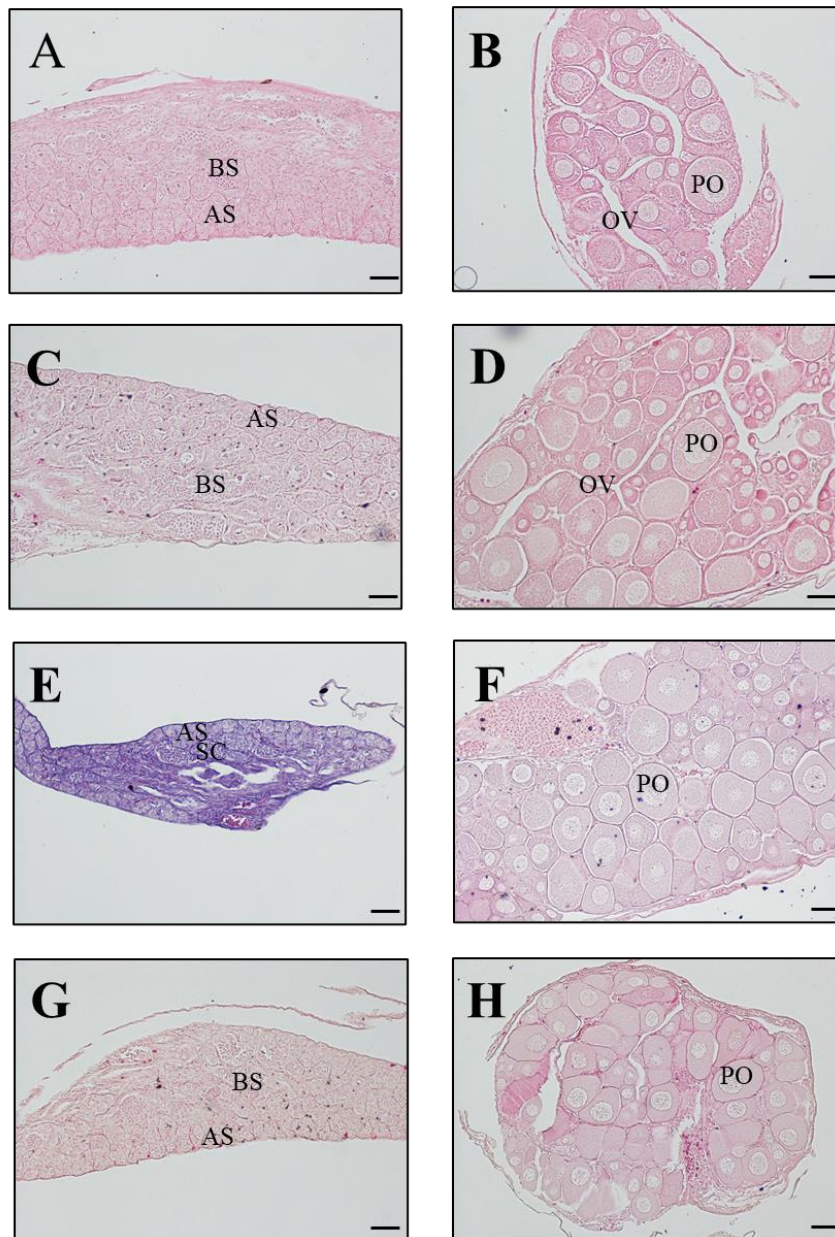
1517

1518

1519

1520

1521



1522

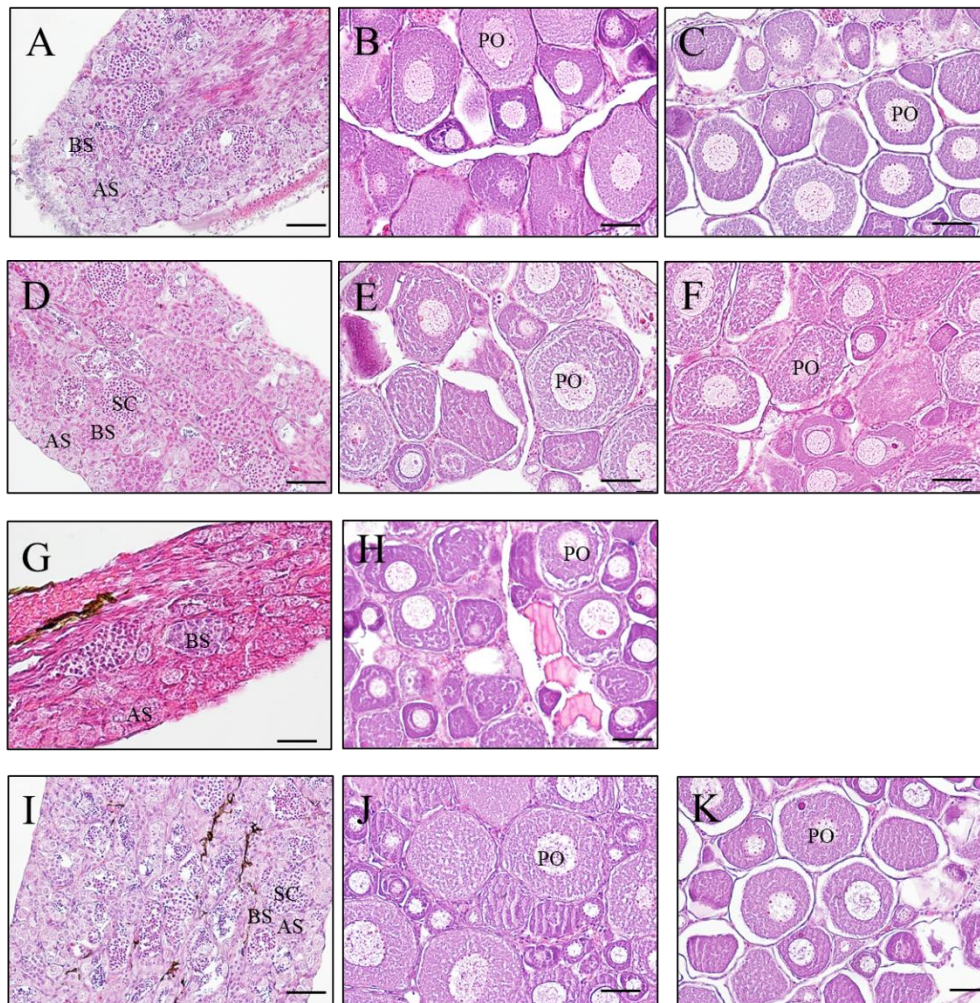
1523 Fig.3. 4

1524 Gonadal histology of Nile tilapia irradiated from different light wavelength.

1525 A, B (White light), C, D (Blue light), E, F (Green light), G, H (Red light). A, C, E, G
 1526 showed genetic male and B, D, F, H showed genetic female.

1527 Type A spermatogonia, B-type spermatogonia, spermatocyte, and spermatocyte including
 1528 developing testis were observed in genetic male (A, C, E, G). Perinucleolar oocyte with
 1529 ovarian cavity were observed in genetic female (B, D, F, H). There was no observed
 1530 abnormal gonad. Scale bars= 50 μ m (A-H). SM: spermatid SC: Spermatocyte BS: B-type
 1531 spermatogonia AS: Type A spermatogonia PO: perinucleolus ovary OV: ovarian cavity

1532



1533
 1534
 1535
 1536
 1537
 1538
 1539
 1540
 1541
 1542
 1543
 1544
 1545
 1546
 1547

Fig.3. 5

Gonadal histology of Nile tilapia irradiated from different light wavelength.

A, B, C (White 24 h light), D, E, F (Red 24 h light), E, F (Green 24 h light), G, H, I (Blue 24 h light). A, C, D, F, G, I, K showed genetic male and B, E, H, J showed genetic female.

Type A spermatogonia, B-type spermatogonia, spermatocyte, and spermatocyte including developing testis were observed in genetic male (A, D, G, I). Perinucleolar stage oocyte with ovarian cavity were observed in genetic female (B, E, H, J). Gonad of perinucleolar stage oocyte were observed in genetic male (C, F, K). Scale bars= 40 μ m (A-K). SC: Spermatocyte BS: B-type spermatogonia AS: Type A spermatogonia PO: perinucleolus ovary

考察

1548

1549

1550 本実験では、ナイルティラピアを用いて近交系メダカでみられた性転換条件と同じ条件

1551 (12 時間明期、12 時間暗期) で飼育を行ったところ、12 時間周期の全ての試験区のオス及

1552 びメス個体の生殖腺で異常な形態は確認されなかった。しかし、24 時間照明試験区では、

1553 遺伝的にオスでありながら卵巣を有する性転換個体が出現した。白色光 24 時間照明試験区

1554 でも性転換個体が見られたが、青色や赤色試験区でより多くの性転換個体が見られたこと

1555 より、光周期と光波長の 2 条件が性転換誘導した要因であることが考えられる。本研究で

1556 は、卵の機能性について確認することが出来なかったが、性転換個体の生殖腺の組織切片を

1557 観察した限りでは、通常の卵細胞と相違ない構造が確認出来た。これらの性転換個体が機能

1558 的な卵を生産することができれば、性染色体が YY である超オスを作成できる可能性があ

1559 る。

1560 ナイルティラピアにおける性転換現象は、ファドロゾール (Fd) やメチルテストステロン

1561 (MT) 等の性ホルモンを用いた性転換と、高水温や低水温による環境要因による性転換が

1562 誘導されることが報告されている。特に、性分化期における MT の投与は、100%性転換が

1563 誘導できる¹⁰⁷。また、成魚であっても Fd を 200 µg/g の濃度で餌に混ぜ合わせ 6 か月間投与

1564 し続けることで機能的な性転換が誘導される¹⁸。一方、高水温暴露による性転換誘導では、

1565 36°C の高水温に暴露することでメスからオスへの性転換が誘導される²³。これらのことか

1566 ら、性ホルモン投与だけではなく、環境要因の変化によっても性転換が誘導される機構を有
1567 していることが考えられる。12 時間周期の試験区では性転換個体が出現しなかったが、24
1568 時間明期の試験区では、白色試験でも性転換個体が出現し、さらに青色、赤色試験区で 21%
1569 の性転換個体が観察された。これまで光と性分化や性転換に関する報告は多くはないが、光
1570 周期と性分化の関係を報告例がある。自然界で入手したトウゴロウイワシ目の *Leuresthes*
1571 *tenuis* の受精卵を研究室内で 17°C、21°C、25°C の水温と 12 時間暗期、12 時間明期の光周期
1572 と 9 時間暗期、15 時間明期の光周期で飼育を行い、性比を比較している¹⁰⁸。その結果、17°C
1573 の水温下で最もメスの比率が高くなり、光周期の試験区では、12 時間の明暗周期に比べて
1574 9 時間暗期、15 時間明期の試験区では有意にメスの比率が高くなっている¹⁰⁸。また、トウ
1575 ゴロウイワシを用いた、別の光周期の実験では、12 時間の明暗周期と 24 時間明期の試験区
1576 で性比を比較したところ、12 時間の明暗周期の試験区では 40% のオスが出現したのに対し
1577 て、24 時間明期の試験区では 73% のオスが出現した¹⁰⁹。この長日周期でのオス化現象と酸
1578 化ストレスの関係に着目し、酸化ストレス関連遺伝子である *sod2*、*ucp2*、*gcr1*、*cat*、*gsr*、
1579 *crf* の遺伝子発現量を測定し、24 時間明期の試験区では *cat*、*gsr*、*crf* が有意に高い発現を示
1580 した。これらは、*crf* の高発現は、ストレスとの関係を示しており、性分化の軸となる視床
1581 下部-下垂体-甲状腺、視床下部-下垂体-甲状腺または、甲状腺-副腎に影響を及ぼしたことを
1582 推察しているが、酸化ストレスと性分化の詳細なメカニズムについては更なる研究が必要
1583 であるとも述べている。本実験でも 24 時間の光照射は、酸化ストレスだけではなく、様々

1584 なストレスを可能性があり、酸化ストレスやコルチゾルを介した性転換である可能性が高
1585 い。

1586 本実験では、2種類の光強度で飼育を行ったが、光強度の違いが成長に影響を及ぼした例
1587 もあり光強度も性転換を誘導した要因の一つである可能性がある。ヨーロッパスズキ
1588 (*Dicentrarchus labrax*) を供試魚として用いた3種類の異なる光強度と4種類の異なる光波
1589 長を組み合わせ照射した飼育試験では、白色及び、青色試験区と比べて緑色、赤色試験区
1590 で有意に成長が良く、これらの波長特異的な成長と共に光強度も 1.0 W/m^2 と 0.3 W/m^2 に比
1591 べて 2.0 W/m^2 の光強度で有意に成長が良い¹⁰⁸。Yan et al.¹⁰⁸ が報告しているように、刺激強
1592 度に応じて成長の変化が見られることから、本章の実験でも光強度を上げることで性分化
1593 に何らかの影響を及ぼす可能性がある。

1594 トウゴロウイワシ目の魚類を用いた実験では、自然界における温度と光周期が性転換を
1595 誘導する要因としてどのような利点があるかについて考察している（引用）。一方、本研究
1596 のように特定の波長のみを発生初期より照射され続ける環境が自然界には存在しないこと
1597 から、特定光波長照射による性転換誘導現象は、性分化期に光刺激を介した内分泌の攪乱が
1598 起きたと考えられる。メカニズムに関しては、不明であるがXY型で卵巣を有する個体が機
1599 能的な卵を作出すれば、次世代でYY型の超オスを作出できる可能性があり全オス生産が
1600 期待できる。

1601

第5章 総合考察

1602

1603

1604 本研究では、環境要因の中でも特に光に着目して、末梢の光受容器官の機能解析から特定
1605 波長光が生殖腺に与える影響について飼育試験を行い、その影響を評価した。メダカの光受
1606 容器官の機能解析では、網膜に着目し、今まで報告がなかったメダカの各波長に対する暗所
1607 下での絶対閾値および、明所下での閾値を明らかにした。これまでメダカの視覚については、
1608 Matsumoto et al.⁵²が各オプシン遺伝子を特定し、オプシントタンパク質のリコンビナントに 11-
1609 シスレチナールを添加して吸光度を測定することで極大分光吸収波長 (λ_{max}) を明らかに
1610 した。その後、オプシン遺伝子ノックアウトメダカを用いた行動試験による視覚解析や、バ
1611 ーチャルディスプレイ等を用いた視覚認識機構について研究が進められてきた^{53,110}。
1612 Homma et al.¹¹¹は、今までの視感度推定は、*in vivo* レベルでの解析を行っておらず、*in vitro*
1613 の実験であるオプシントタンパク質と 11-シスレチナールを用いた極大吸収波長と、これまで
1614 の電気生理による視感度と行動試験の結果は、同一である必要がないだろうと述べている。
1615 一方で、電気生理学的な手法（網膜電図）を用いてメダカの視覚を解析した例は、Makhankov
1616 et al.⁴⁴のみであり、メダカ、ゼブラフィッシュとネッタイツメガエル (*Xenopus tadpoles*) を
1617 用いて白色電球を光源として用いて光刺激を行い、a 波と b 波の振幅を基準とした ON 応答
1618 と OFF 応答を記録を記録している。この論文でのメダカの位置付けは、小型魚類の代表例
1619 として用いているに過ぎず、波長別に視感度や閾値を求めていない。したがって、本研究で

1620 明らかにしたメダカにおける電気生理学的な手法（網膜電図）を用いた暗所および明所での
1621 視感度および閾値の解析結果は、光照射試験の際の光波長の選択や光強度の決定にとどま
1622 らず、メダカの視覚機能の基礎的な知見を深めた。

1623 本研究では、電気生理学的な知見、および性分化期のオプシン遺伝子の発現情報をもとに、
1624 性分化期から特定光波長を照射することで、近交系メダカで遺伝的メスからオスへの性転
1625 換が誘導されることを明らかにした。近年、光波長に着目した研究は多く、特に異体類を中
1626 心に緑色光照射が内分泌機構を介して成長を向上させることが報告されている³⁶⁻³⁸。しか
1627 し、特定の光波長の照射が性分化に与える影響については報告がなかった。本研究では、近
1628 交系メダカ Hd-rR111 系統と *olvas-GFP* 系統の 2 系統で白色コントロール区に比べて高い性
1629 転換率がみられたものの、ヒメダカ系統では性転換が見られなかった。過去の研究では、通
1630 常状態で近交系メダカでは遺伝的なメスからオスへの性転換が見られることが報告されて
1631 いる¹¹²。同じ種でありながら系統間において性転換率が異なる要因については明らかにな
1632 っていない。ミナミニホンメダカ (*Oryzias latipes*) とハイナンメダカ (*Oryzias curvinotus*)
1633 は両種共に Y 染色体上に性決定遺伝子 *dmy* を有し、性分化過程も似ており初期の生殖細胞
1634 数が雌雄で異なることが明らかとなっている^{12,113}。この同じ性決定遺伝子を有し、別種であ
1635 るメダカのハイブリットを作出し、性転換率を観察したところハイナンメダカのメスとミ
1636 ナミニホンメダカのオスを交配させた試験区では、XX 卵巢、XY 精巢、さらに XY 卵巢の
1637 個体が 21%出現したが、一方でハイナンメダカのオスとミナミニホンメダカのメスの交雑

1638 種では、XY 卵巣個体は出現しない¹¹⁴。このことから同じ性決定遺伝子を有していても種間
1639 で Y 染色体の性決定機能に差があることが考えられる。また、Hd-rRll1 系統と HNI 系統で
1640 は、性決定遺伝子 *dmy* を有するが、下流の遺伝子発現のカスケードが異なることも報告さ
1641 れている¹¹⁵。これらのことから、系統間で性決定遺伝子 *dmy* の発現量や機能だけではなく、
1642 下流のカスケードが異なっている可能性や、系統間で光刺激に対する応答が異なっている
1643 可能性があり、それによって性転換率が異なった可能性がある。

1644 本研究では緑色光照射試験区で性分化期にコルチゾルの上昇は見られなかった。性転換個
1645 体を選別してコルチゾルアッセイを行っていないので議論の余地があるが、他の性転換機
1646 構が関与している可能性も考えられる。遺伝的なメスが表現型のオスへ性転換することに
1647 関する報告の多くはコルチゾルを介している^{33,81,89}。さらに、コルチゾルの下流では、脂肪
1648 酸受容体 PPAR α を介して *gsdf* と *amhr2* の発現を制御し、*dmrt1* を介してオス化することを
1649 指摘している^{116,117}。また、孵化後 5 日令までの飢餓状態にしたメダカでメスからオスへの
1650 性転換が誘導され、パントテン酸の代謝が抑制され脂肪酸合成が抑制されることで *dmrt1* の
1651 発現が上昇しオス化する⁸²。これらの結果は、メダカのメスからオスへの性転換という事象
1652 に脂質が関与している可能性を示している。マウスを用いた実験では、特定の光波長照射と
1653 肝臓における脂質代謝についての機構について詳しく述べている。非視覚オプシンに属す
1654 る *opsin3* のホモログを、培養細胞 (HEK293S) に過剰発現させ 11、9、13-シスレチナール
1655 共に培養したところ光受容能を持つことが報告された¹¹⁸。マウスを用いた研究で、非視覚

1656 オプシンに属する opsin3 は脂肪組織で発現し青色 (480 nm) に感受性を持ち、この opsin3
1657 ノックアウトマウスは野生型マウスに比べて肥満になりやすく脂質を貯蔵する白色脂肪細
1658 胞が多く、代謝する褐色脂肪細胞で熱生産に関連する遺伝子発現が低下する^{94,119}。Sato et al.
1659⁹⁴ は、マウスの生体内の褐色脂肪細胞に外科的な処理を通して直接 LED ライトを照射する
1660 と、通常のマウスでは酸素消費量や熱生産量が増加したのに対して opsin3 ノックアウトマ
1661 ウスではそれらが見られなかったことを報告している⁹⁴。これらのことから、視覚を介さずに
1662 細胞で発現する光受容体が、直接細胞に照射される光刺激を受容して代謝を変化させるこ
1663 とや、メダカの性転換誘導現象が脂質を介して性関連遺伝子の発現を制御していたことか
1664 ら、本研究における性転換誘導現象も視覚以外の組織における光受容体が光刺激を受容し、
1665 内分泌機構を介して性転換が誘導された可能性がある。

1666 今回、性転換を誘導した光刺激が網膜を通して内分泌系に影響を及ぼしたかについては
1667 明らかにできなかった。アイレスメダカを作出し、緑色光を照射することで性転換が誘導さ
1668 れるかどうかが試みたが、眼の発生のマスター遺伝子である *pax6* ノックアウトメダカは、孵
1669 化後 5 日程度で全滅したため、飼育実験を実施することが出来なかった (データ未発表)。

1670 一方で、メダカを含めた魚類では、網膜以外にもオプシン遺伝子の発現が報告されており
1671¹²⁰、生理機能が未知であるものが多い。これらの中で、非視覚オプシンと性に関連した報告
1672 は、Choi and Choi 2020³⁹ で、キンギョにおける VAL-opsin と性成熟関連遺伝子発現の関係性
1673 について検討しており、他にもウズラ (*Coturnix japonica*) の深脳部にある opsin5 と精巢の性

1674 成熟の関係^{72,121}、ニホンウナギの性成熟個体と非成熟個体で網膜、および脳における opsin4
1675 サブファミリー、opsin5 サブファミリー、opsin3、TMT opsin サブファミリー、VA-opsin、
1676 parapinopsin の発現の差異が見られたことは報告されているが¹²²、性分化と非視覚系オプシ
1677 ンの関係については不明である。

1678 ナイルティラピアを用いた光照射実験では、既存の性マーカーが表現型の性と一致し、安
1679 定して受精卵を得られるナイルティラピアの飼育実験を確立した。この方法で飼育した魚
1680 体で、光照射試験を行ったところ、遺伝的な性と表現型の性が不一致となる個体を確認出来
1681 た。交配試験を行うまでには至らなかったが、性転換個体の生殖腺の組織観察で異常な構造
1682 は確認されなかったことから、正常な次世代を作出できる可能性が高い。このことから、ナ
1683 イルティラピアでも光環境制御によって、性転換個体の次世代の超オス作出からの全オス
1684 生産が期待できる。

1685 本論文では、モデルフィッシュであるメダカを用いて、各光波長に対する明暗所下での視
1686 感度と閾値を明らかにした。また、性分化に影響を及ぼす環境要因として光波長が要因とな
1687 っていることをはじめて示した。さらに、水産養殖対象種であるナイルティラピアでも、光
1688 周期と光波長を制御することで性転換個体が出現することを確認した。現在、養殖業対象と
1689 した光波長の制御による成長、成熟、性分化等の魚類の生理状態を制御する技術の開発が行
1690 われている。本研究で得られた知見が、光波長を用いた新たな養殖技術の開発の一助となる
1691 と信じる。

謝辞

1692

1693 本研究を遂行し学位論文作成に当たり、全面的な支援をして下さった主指導教員である

1694 鹿児島大学水産学部教授 小谷知也教授に心より感謝申し上げます。小谷先生には、学部生

1695 の頃より、自由に研究活動をさせて頂き長きにわたり研究活動から日常生活まで様々なこ

1696 とを相談しアドバイスを頂きました。特に、第二章の研究の着想に至っては小谷先生のご指

1697 導なしには、進めることが出来ませんでした。また、修士課程時にベトナムで感染症になっ

1698 た際にも現地まで迎えに来て下さったことは、決して忘れない恩です。ここにお礼申し上げ

1699 ます。

1700 魚類の生殖生理に関する基本的な知見から、学会発表でのプレゼンテーションの作り方、

1701 論文執筆等を親身に指導して下さった金沢大学理工学類 竹内裕教授に心より感謝申し上

1702 げます。

1703 電気生理の実験を初めから教えて下さり論文執筆まで親身に指導して下さった鹿児島大

1704 学水産学部 安楽和彦教授に心より感謝申し上げます。研究以外のことでも親身に相談に

1705 のって頂いたことに深くお礼申し上げます。

1706 本研究を行うにあたり近交系メダカの使用を勧めて下さり、様々なご助言を頂いた鹿児

1707 島大学水産学部 塩崎一弘准教授に心より感謝申し上げます。研究機材等も快く貸し出し

1708 て下さり、時には明るく励まして頂いたことをお礼申し上げます。

1709 副査を引き受け頂くと共に、博士論文作成にあたりご助言を頂いた鹿児島大学水産学部

1710 山本 淳教授、鹿児島大学農学部 三好 和睦教授に感謝申し上げます。

1711 日頃の研究活動から日々の生活等の相談にのって頂きアドバイスや励ましの言葉を下さ

1712 った鹿児島大学水産学部研究員 松井英明氏に感謝申し上げます。また、長きにわたり所属

1713 していました水産増養殖研究室の皆様に感謝申し上げます。

1714

1715

1716

1717

1718

1719

1720

1721

1722

1723

1724

1725

1726

1727

参考文献

1728

1729

- 1730 1. FAO, IFAD, UNICEF, W. and W. The State of Food Security and Nutrition in the World
1731 (SOFIA). *FAO, IFAD, UNICEF, WFP WHO* (2020). doi:<https://doi.org/10.4060/ca9692en>
- 1732 2. Yan, H. *et al.* Identification of genes involved in gonadal sex differentiation and the dimorphic
1733 expression pattern in Takifugu rubripes gonad at the early stage of sex differentiation. *Fish*
1734 *Physiol. Biochem.* **44**, 1275–1290 (2018).
- 1735 3. Fopp-Bayat. Genome manipulation and sex control in the siberian sturgeon: an updated synthesis
1736 with regard to objectives, constraints and findings. in *genome manipulation and sex control in the*
1737 *siberian sturgeon: an updated synthesis with regard to objectives, constraints and findings* (eds.
1738 P., W., G., N. & M., C.) 327–336 (2018).
- 1739 4. Vizziano-Cantonnet, D., Lasalle, A., Di Landro, S., Klopp, C. & Genthon, C. De novo
1740 transcriptome analysis to search for sex-differentiation genes in the Siberian sturgeon. *Gen.*
1741 *Comp. Endocrinol.* **268**, 96–109 (2018).
- 1742 5. Yamamoto, E. Studies on sex-manipulation and production of cloned populations in hirame,
1743 *Paralichthys oliuaceus* (Temminck et Schlegel). *Aquaculture* **173**, 235–246 (1999).
- 1744 6. Beardmore, J. A., Mair, G. C. & Lewis, R. I. Monosex male production in finfish as exemplified
1745 by tilapia: Applications, problems, and prospects. *Aquaculture* **197**, 283–301 (2001).

- 1746 7. Cnaani, A. & Levavi-Sivan, B. Sexual development in fish, practical applications for aquaculture.
1747 *Sex. Dev.* **3**, 164–175 (2009).
- 1748 8. Martínez, P. *et al.* Genetic architecture of sex determination in fish: Applications to sex ratio
1749 control in aquaculture. *Front. Genet.* **5**, 1–13 (2014).
- 1750 9. Xu, D. *et al.* Production of neo-males from gynogenetic yellow drum through 17 α -
1751 methyltestosterone immersion and subsequent application for the establishment of all-female
1752 populations. *Aquaculture* **489**, 154–161 (2018).
- 1753 10. Siegfried, K. R. In search of determinants: Gene expression during gonadal sex differentiation. *J.*
1754 *Fish Biol.* **76**, 1879–1902 (2010).
- 1755 11. Devlin, R. H. & Nagahama, Y. Sex determination and sex differentiation in fish: An overview of
1756 genetic, physiological, and environmental influences. *Aquaculture* **208**, 191–364 (2002).
- 1757 12. Matsuda, M. *et al.* DMY is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the
1758 medaka fish. *Nature* **399**, 559–563 (2002).
- 1759 13. Nanda, I. *et al.* A duplicated copy of DMRT1 in the sex-determining region of the Y chromosome
1760 of the medaka, *Oryzias latipes*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 1–6 (2002).
- 1761 14. Hattori, R. S. *et al.* A Y-linked anti-Müllerian hormone duplication takes over a critical role in
1762 sex determination. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 2955–2959 (2012).
- 1763 15. Kamiya, T. *et al.* A trans-species missense SNP in Amhr2 is associated with sex determination in

- 1764 the tiger Pufferfish, *Takifugu rubripes* (Fugu). *PLoS Genet.* **8**, (2012).
- 1765 16. Yano, A. *et al.* An immune-related gene evolved into the master sex-determining gene in rainbow
1766 trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Curr. Biol.* **22**, 1423–1428 (2012).
- 1767 17. Sun, L. N. *et al.* Transdifferentiation of differentiated ovary into functional testis by long-term
1768 treatment of aromatase inhibitor in Nile tilapia. *Endocrinology* **155**, 1476–1488 (2014).
- 1769 18. Paul-Prasanth, B. *et al.* Estrogen oversees the maintenance of the female genetic program in
1770 terminally differentiated gonochorists. *Sci. Rep.* **3**, 2862 (2013).
- 1771 19. Hattori, R. S., Castañeda-Cortés, D. C., Arias Padilla, L. F., Strobl-Mazzulla, P. H. & Fernandino,
1772 J. I. Activation of stress response axis as a key process in environment-induced sex plasticity in
1773 fish. *Cell. Mol. Life Sci.* **77**, 4223–4236 (2020).
- 1774 20. Conover, D. O. & Kynard, B. E. Environmental sex determination: Interaction of temperature and
1775 genotype in a fish. *Science (80-.)*. **213**, 577–579 (1981).
- 1776 21. Ribas, L. *et al.* Heat-induced masculinization in domesticated zebrafish is family-specific and
1777 yields a set of different gonadal transcriptomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E941–E950 (2017).
- 1778 22. Sato, T., Endo, T., Yamahira, K., Hamaguchi, S. & Sakaizumi, M. Induction of female-to-male
1779 sex reversal by high temperature treatment in Medaka, *Oryzias latipes*. *Zoolog. Sci.* **22**, 985–988
1780 (2005).
- 1781 23. Baroiller, J. F., D’Cotta, H., Bezault, E., Wessels, S. & Hoerstgen-Schwark, G. Tilapia sex

- 1782 determination: Where temperature and genetics meet. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr.*
- 1783 *Physiol.* **153**, 30–38 (2009).
- 1784 24. Strüssmann, C. A., Conover, D. O., Somoza, G. M. & Miranda, L. A. Implications of climate
- 1785 change for the reproductive capacity and survival of New World silversides (family
- 1786 Atherinopsidae). *J. Fish Biol.* **77**, 1818–1834 (2010).
- 1787 25. Römer, U. & Beisenherz, W. Environmental determination of sex in *Apistogramma*(Cichlidae)
- 1788 and two other freshwater fishes (Teleostei). *Journal fish Biol.* **48**, 714–725 (1996).
- 1789 26. Reddon, A. R. & Hurd, P. L. Water pH during early development influences sex ratio and male
- 1790 morph in a West African cichlid fish, *Pelvicachromis pulcher*. *Zoology* **116**, 139–143 (2013).
- 1791 27. Cheung, C. H. Y., Chiu, J. M. Y. & Wu, R. S. S. Hypoxia turns genotypic female medaka fish into
- 1792 phenotypic males. *Ecotoxicology* **23**, 1260–1269 (2014).
- 1793 28. Shang, E. H. H., Yu, R. M. K. & Wu, R. Hypoxia affects sex differentiation and development,
- 1794 leading to a male-dominated population in zebrafish (*Danio rerio*). *Environ. Sci. Technol.* **40**,
- 1795 3118–3122 (2006).
- 1796 29. Geffroy, B. & Bardounet, A. Sex differentiation and sex determination in eels: Consequences for
- 1797 management. *Fish Fish.* **17**, 375–398 (2016).
- 1798 30. Geffroy, B. & Douhard, M. The Adaptive Sex in Stressful Environments. *Trends Ecol. Evol.* **34**,
- 1799 628–640 (2019).

- 1800 31. Fernandino, J. I., Hattori, R. S., Kishii, A., Strüssmann, C. A. & Somoza, G. M. The cortisol and
1801 androgen pathways cross talk in high temperature-induced masculinization: The 11 β -
1802 hydroxysteroid dehydrogenase as a key enzyme. *Endocrinology* **153**, 6003–6011 (2012).
- 1803 32. Hattori, R. S. *et al.* Cortisol-induced masculinization: Does thermal stress affect gonadal fate in
1804 pejerrey, a teleost fish with temperature-dependent sex determination? *PLoS One* **4**, e6548
1805 (2009).
- 1806 33. Yamaguchi, T., Yoshinaga, N., Yazawa, T., Gen, K. & Kitano, T. Cortisol is involved in
1807 temperature-dependent sex determination in the Japanese flounder. *Endocrinology* **151**, 3900–
1808 3908 (2010).
- 1809 34. Lin, J. J., Wang, F. Y., Li, W. H. & Wang, T. Y. The rises and falls of opsin genes in 59 ray-
1810 finned fish genomes and their implications for environmental adaptation. *Sci. Rep.* **7**, 15568
1811 (2017).
- 1812 35. Musilova, Z. *et al.* Vision using multiple distinct rod opsins in deep-sea fishes. *Science* (80-.).
1813 **592**, 588–592 (2019).
- 1814 36. Yamanome, T., Mizusawa, K., Hasegawa, E. & Takahashi, A. Green light stimulates somatic
1815 growth in the barfin flounder *Verasper moseri*. *J. Exp. Zool.* **79**, 73–79 (2009).
- 1816 37. Takahashi, A., Kasagi, S., Murakami, N., Furufuji, S. & Kikuchi, S. Chronic effects of light
1817 irradiated from LED on the growth performance and endocrine properties of barfin flounder

- 1818 *Verasper moseri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **232**, 101–108 (2016).
- 1819 38. Shimizu, D. *et al.* Effects of green light on the growth of spotted halibut, *Verasper variegatus*,
1820 and Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, and on the endocrine system of spotted halibut at
1821 different water temperatures. *Gen. Comp. Endocrinol.* **271**, 82–90 (2019).
- 1822 39. Choi, J. Y. & Choi, C. Y. Gonadotropin-releasing hormone-independent effects of recombinant
1823 vertebrate ancient long opsin in the goldfish *Carassius auratus* reveal alternative reproduction
1824 pathways. *Fish Physiol. Biochem.* **46**, 1219–1227 (2020).
- 1825 40. Ford, M., Bragadóttir, R., Rakoczy, P. E. & Narfström, K. Gene transfer in the RPE65 null
1826 mutation dog: Relationship between construct volume, visual behavior and electroretinographic
1827 (ERG) results. *Doc. Ophthalmol.* **107**, 79–86 (2003).
- 1828 41. Fritsches, K. A., Brill, R. W. & Warrant, E. J. Warm eyes provide superior vision in swordfishes.
1829 *Curr. Biol.* **15**, 55–58 (2005).
- 1830 42. L.Maffei, A.Fiorentini, S.Bisti & H.Hollander. Pattern ERG in the monkey after section of the
1831 optic nerve. *Exp. Brain Resarch* **59**, 423–425 (1985).
- 1832 43. Marmor, M. F., Holder, G. E., Seeliger, M. W. & Yamamoto, S. Standard for clinical
1833 electroretinography (2004 update). *Doc. Ophthalmol.* **108**, 107–114 (2004).
- 1834 44. Makhankov, Y. V., Rinner, O. & Neuhauss, S. C. F. An inexpensive device for non-invasive
1835 electroretinography in small aquatic vertebrates. *J. Neurosci. Methods* **135**, 205–210 (2004).

- 1836 45. Matsumoto, T. *et al.* Spectral sensitivity of juvenile chub mackerel (*Scomber japonicus*) in visible
1837 and ultraviolet light. *Fish Physiol. Biochem.* **36**, 63–70 (2010).
- 1838 46. Shao, Y. T. *et al.* Androgens increase lws opsin expression and red sensitivity in male three-
1839 spined sticklebacks. *PLoS One* **9**, e100330 (2014).
- 1840 47. Frishman, L. J. & Wang, M. H. *Electroretinogram of human, monkey and mouse. Adler's*
1841 *Physiology of the Eye* (2011).
- 1842 48. Naka, K. I. & Rushton, W. A. H. An attempt to analyse colour reception by electrophysiology. *J.*
1843 *Physiol.* **185**, 556–586 (1966).
- 1844 49. Stavenga, D. G., Smits, R. P. & Hoenders, B. J. Simple exponential functions describing the
1845 absorbance bands of visual pigment spectra. *Vision Res.* **33**, 1011–1017 (1993).
- 1846 50. Ishikawa, Y. Medakafish as a model system for vertebrate developmental genetics. *BioEssays* **22**,
1847 487–495 (2000).
- 1848 51. Zhu, B. & Ge, W. Genome editing in fishes and their applications. *Gen. Comp. Endocrinol.* **257**,
1849 3–12 (2018).
- 1850 52. Matsumoto, Y., Fukamachi, S., Mitani, H. & Kawamura, S. Functional characterization of visual
1851 opsin repertoire in Medaka (*Oryzias latipes*). *Gene* **371**, 268–278 (2006).
- 1852 53. Shimmura, T. *et al.* Dynamic plasticity in phototransduction regulates seasonal changes in color
1853 perception. *Nat. Commun.* **8**, 412 (2017).

- 1854 54. Nishiwaki, Y., Oishi, T., Tokunaga, F. & Morita, T. Three-dimensional reconstitution of cone
1855 arrangement on the spherical surface of the retina in the medaka eyes. *Zoological Science* **14**,
1856 795–801 (1997).
- 1857 55. Hawryshyn, C. W., Haimberger, T. J. & Deutschlander, M. E. Microspectrophotometric
1858 measurements of vertebrate photoreceptors using CCD-based detection technology. *J. Exp. Biol.*
1859 **204**, 2431–2438 (2001).
- 1860 56. Matsubara, H. *et al.* New photic stimulating system with white light-emitting diodes to elicit
1861 electroretinograms from zebrafish larvae. *Doc. Ophthalmol.* **135**, 147–154 (2017).
- 1862 57. Yan, H. Y. Auditory role of the suprabranchial chamber in gourami fish. *J. Comp. Physiol. - A*
1863 *Sensory, Neural, Behav. Physiol.* **183**, 325–333 (1998).
- 1864 58. Yan, H. Y. & Curtsinger, W. S. The otic gasbladder as an ancillary auditory structure in a
1865 mormyrid fish. *J. Comp. Physiol. - A Sensory, Neural, Behav. Physiol.* **186**, 595–602 (2000).
- 1866 59. Yokoyama, S. Molecular evolution of vertebrate visual pigments. *Prog. Retin. Eye Res.* **19**, 385–
1867 419 (2000).
- 1868 60. Allison, W. T., Haimberger, T. J., Hawryshyn, C. W. & Temple, S. E. Visual pigment
1869 composition in zebrafish: Evidence for a rhodopsin-porphyropsin interchange system. *Vis.*
1870 *Neurosci.* **21**, 945–952 (2004).
- 1871 61. Hisatomi, O., Satoh, T. & Tokunaga, F. The primary structure and distribution of killifish visual

- 1872 pigments. *Vision Res.* **37**, 3089–3096 (1997).
- 1873 62. Robinson, J., Schmitt, E. A., Hárosi, F. I., Reece, R. J. & Dowling, J. E. Zebrafish ultraviolet
 1874 visual pigment: Absorption spectrum, sequence, and localization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
 1875 **90**, 6009–6012 (1993).
- 1876 63. Flamarique, I. N. Opsin switch reveals function of the ultraviolet cone in fish foraging. *Proc. R.*
 1877 *Soc. B Biol. Sci.* **280**, 20122490 (2013).
- 1878 64. Glass, C. W., Wardle, C. S. & Mojsiewicz, W. R. A light intensity threshold for schooling in the
 1879 Atlantic mackerel, *Scomber scombrus*. *J. Fish Biol.* **29**, 71–81 (1986).
- 1880 65. Hunter, J. & Nicholl, R. Visual threshold for schooling in northern anchovy *Engraulis mordax*.
 1881 *Fish. Bull.* **83**, 235–242 (1985).
- 1882 66. Hunter, J. R. Effects of light on schooling and feeding of jack mackerel, *Trachurus symmetricus*.
 1883 *J. Fish. Res. Board Canada* **25**, 393–407 (1968).
- 1884 67. Matsuda, K., Kamoshida, M. & Masuda, Y. Wavelength-specific thresholds of artificially reared
 1885 Japanese eel *Anguilla japonica* larvae determined from negative-phototactic behaviours. *J. Fish*
 1886 *Biol.* **95**, 1040–1045 (2019).
- 1887 68. Chrispell, J. D., Rebrik, T. I. & Weiss, E. R. Electroretinogram analysis of the visual response in
 1888 zebrafish larvae. *J. Vis. Exp.* **2015**, 1–7 (2015).
- 1889 69. Seeliger, M. W., Rilk, A. & Neuhauss, S. C. F. Ganzfeld ERG in zebrafish larvae. *Doc.*

- 1890 *Ophthalmol.* **104**, 57–68 (2002).
- 1891 70. Xie, J., Jusuf, P. R., Goodbourn, P. T. & Bui, B. V. Electroretinogram recording in larval
1892 zebrafish using a novel cone-shaped sponge-tip electrode. *J. Vis. Exp.* e59487 (2019).
- 1893 71. Naka, K. I. & Rushton, W. A. H. S-potentials from luminosity units in the retina of fish
1894 (Cyprinidae). *J. Physiol.* **185**, 587–599 (1966).
- 1895 72. Nakane, Y. *et al.* A mammalian neural tissue opsin (Opsin 5) is a deep brain photoreceptor in
1896 birds. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**, 15264–15268 (2010).
- 1897 73. Nakane, Y. *et al.* The saccus vasculosus of fish is a sensor of seasonal changes in day length. *Nat.*
1898 *Commun.* **4**, 2108 (2013).
- 1899 74. Karakatsouli, N. *et al.* Effects of light spectrum on growth and stress response of rainbow trout
1900 *Oncorhynchus mykiss* reared under recirculating system conditions. *Aquac. Eng.* **38**, 36–42
1901 (2008).
- 1902 75. Villamizar, N., García-Alcazar, A. & Sánchez-Vázquez, F. J. Effect of light spectrum and
1903 photoperiod on the growth, development and survival of European sea bass (*Dicentrarchus*
1904 *labrax*) larvae. *Aquaculture* **292**, 80–86 (2009).
- 1905 76. Papoutsoglou, S. E., Karakatsouli, N., Papoutsoglou, E. S. & Vasilikos, G. Common carp
1906 (*Cyprinus carpio*) response to two pieces of music (‘Eine Kleine Nachtmusik’ and ‘Romanza’)
1907 combined with light intensity, using recirculating water system. *Fish Physiol. Biochem.* **36**, 539–

- 1908 554 (2010).
- 1909 77. Shin, H. S., Lee, J. & Choi, C. Y. Effects of LED light spectra on oxidative stress and the
1910 protective role of melatonin in relation to the daily rhythm of the yellowtail clownfish,
1911 *Amphiprion clarkii*. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* **160**, 221–228 (2011).
- 1912 78. Shin, H. S. & Choi, C. Y. The stimulatory effect of LED light spectra on genes related to
1913 photoreceptors and skin pigmentation in goldfish (*Carassius auratus*). *Fish Physiol. Biochem.* **40**,
1914 1229–1238 (2014).
- 1915 79. Yamaguchi, T., Yoshinaga, N., Yazawa, T., Gen, K. & Kitano, T. Cortisol is involved in
1916 temperature-dependent sex determination in the Japanese flounder. *Endocrinology* **151**, 3900–
1917 3908 (2010).
- 1918 80. Navarro-Martín, L. *et al.* DNA methylation of the gonadal aromatase (cyp19a) promoter is
1919 involved in temperature-dependent sex ratio shifts in the European sea bass. *PLoS Genet.* **7**,
1920 e1002447. (2011).
- 1921 81. Hayashi, Y. *et al.* High temperature causes masculinization of genetically female medaka by
1922 elevation of cortisol. **686**, 679–686 (2010).
- 1923 82. Sakae, Y. *et al.* Starvation causes female-to-male sex reversal through lipid metabolism in the
1924 teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *Biol. Open* **9**, bio050054 (2020).
- 1925 83. Chinen, A., Hamaoka, T., Yamada, Y. & Kawamura, S. Gene duplication and spectral

- 1926 diversification of cone visual pigments of zebrafish. *Genetics* **163**, 663–675 (2003).
- 1927 84. Hattori, R. S. *et al.* Cortisol-induced masculinization: Does thermal stress affect gonadal fate in
- 1928 pejerrey, a teleost fish with temperature-dependent sex determination? *PLoS One* **4**, e6548
- 1929 (2009).
- 1930 85. Hori, M. & Suzuki, A. Lethal effect of blue light on strawberry leaf beetle, *Galerucella grisea*
- 1931 (Coleoptera : Chrysomelidae). *Sci. Rep.* **7**, 2694 (2017).
- 1932 86. Hori, M., Shibuya, K., Sato, M. & Saito, Y. Lethal effects of short-wavelength visible light on
- 1933 insects. *Sci. Rep.* **4**, 7383 (2014).
- 1934 87. Kurokawa, H. *et al.* Germ cells are essential for sexual dimorphism in the medaka gonad. *Proc.*
- 1935 *Natl. Acad. Sci.* **104**, 16958–16963 (2007).
- 1936 88. Morinaga, C. *et al.* The hotei mutation of medaka in the anti-Mullerian hormone receptor causes
- 1937 the dysregulation of germ cell and sexual development. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **104**, 9691–9696
- 1938 (2007).
- 1939 89. Kitano, T., Hayashi, Y. & Shiraishi, E. R. I. Estrogen rescues masculinization of genetically
- 1940 female medaka by exposure to cortisol or high temperature. *Mol. Reprod. Dev.* **79**, 719–726
- 1941 (2012).
- 1942 90. Selim, K. M., Shinomiya, A., Otake, H., Hamaguchi, S. & Sakaizumi, M. Effects of high
- 1943 temperature on sex differentiation and germ cell population in medaka, *Oryzias latipes*.

- 1944 *Aquaculture* **289**, 340–349 (2009).
- 1945 91. Hattori, R. S. *et al.* Temperature-dependent sex determination in Hd-rR medaka *Oryzias latipes* :
 1946 Gender sensitivity , Thermal threshold , Critical period , and DMRT1 Expression Profile. *Sex.*
 1947 *Dev.* **8477**, 138–146 (2007).
- 1948 92. Castañeda Cortés, D. C., Arias Padilla, L. F., Langlois, V. S., Somoza, G. M. & Fernandino, J. I.
 1949 The central nervous system acts as a transducer of stress-induced masculinization through
 1950 corticotropin-releasing hormone B. *Dev.* **146**, dev172866 (2019).
- 1951 93. Hara, S., Furukawa, F., Mukai, K., Yazawa, T. & Kitano, T. Peroxisome proliferator-activated
 1952 receptor alpha is involved in the temperature-induced sex differentiation of a vertebrate. *Sci. Rep.*
 1953 **10**, (2020).
- 1954 94. Sato, M. *et al.* Cell-autonomous light sensitivity via Opsin3 regulates fuel utilization in brown
 1955 adipocytes. *PLoS Biol.* **18**, e3000630 (2020).
- 1956 95. Fischer, R. M. *et al.* Co-expression of VAL- and TMT-opsins uncovers ancient photosensory
 1957 interneurons and motorneurons in the vertebrate brain. *PLoS Biol.* **11**, e1001585 (2013).
- 1958 96. Quiroga Artigas, G. *et al.* A gonad-expressed opsin mediates light-induced spawning in the
 1959 jellyfish clytia. *Elife* **7**, e29555 (2018).
- 1960 97. Shinomiya, A. *et al.* Field survey of sex-reversals in the medaka , *Oryzias latipes* : Genotypic
 1961 sexing of wild populations. *Zoolog. Sci.* **21**, 613–619 (2004).

- 1962 98. Adolphi, M. C. *et al.* Increase of cortisol levels after temperature stress activates *dmrt1a* causing
1963 female-to-male sex reversal and reduced germ cell number in medaka. *Mol. Reprod. Dev.* **86**,
1964 1405–1417 (2019).
- 1965 99. Castañeda-Cortés, D. C., Zhang, J., Boan, A. F., Langlois, V. S. & Fernandino, J. I. High
1966 temperature stress response is not sexually dimorphic at the whole-body level and is dependent on
1967 androgens to induce sex reversal. *General and Comparative Endocrinology* **299**, 113605 (2020).
- 1968 100. Frisch, A. Sex-change and gonadal steroids in sequentially-hermaphroditic teleost fish. *Rev. Fish*
1969 *Biol. Fish.* **14**, 481–499 (2004).
- 1970 101. Budd, A., Banh, Q., Domingos, J. & Jerry, D. Sex control in fish: Approaches, challenges and
1971 opportunities for aquaculture. *J. Mar. Sci. Eng.* **3**, 329–355 (2015).
- 1972 102. Goikoetxea, A., Todd, E. V. & Gemmell, N. J. Stress and sex: Does cortisol mediate sex change
1973 in fish? *Reproduction* **154**, R149–R160 (2017).
- 1974 103. She, Z. Y. & Yang, W. X. Sry and SoxE genes: How they participate in mammalian sex
1975 determination and gonadal development? *Semin. Cell Dev. Biol.* **63**, 13–22 (2017).
- 1976 104. Chen, J., Fan, Z., Tan, D., Jiang, D. & Wang, D. A review of genetic advances related to sex
1977 control and manipulation in tilapia. *J. World Aquac. Soc.* **49**, 277–291 (2018).
- 1978 105. Li, M. *et al.* A tandem duplicate of anti-Müllerian hormone with a missense SNP on the Y
1979 Chromosome is essential for male sex determination in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *PLoS*

- 1980 *Genet.* **11**, 1–23 (2015).
- 1981 106. Sissao, R., D’Cotta, H., Baroiller, J. F. & Toguyeni, A. Mismatches between the genetic and
- 1982 phenotypic sex in the wild Kou population of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *PeerJ* **7**, e7709
- 1983 (2019).
- 1984 107. Bhandari, R. K., Nakamura, M., Kobayashi, T. & Nagahama, Y. Suppression of steroidogenic
- 1985 enzyme expression during androgen-induced sex reversal in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*).
- 1986 *Gen. Comp. Endocrinol.* **145**, 20–24 (2006).
- 1987 108. Brown, E. E., Baumann, H. & Conover, D. O. Temperature and photoperiod effects on sex
- 1988 determination in a fish. *J. Exp. Mar. Bio. Ecol.* **461**, 39–43 (2014).
- 1989 109. Corona-Herrera, G. A. *et al.* Experimental evidence of masculinization by continuous
- 1990 illumination in a temperature sex determination teleost (Atherinopsidae) model: is oxidative stress
- 1991 involved? *J. Fish Biol.* **93**, 229–237 (2018).
- 1992 110. Harada, Y., Matsuo, M., Kamei, Y., Goto, M. & Fukamachi, S. Evolutionary history of the
- 1993 medaka long-wavelength sensitive genes and effects of artificial regression by gene loss on
- 1994 behavioural photosensitivity. *Sci. Rep.* **9**, 2726 (2019).
- 1995 111. Homma, N., Harada, Y., Uchikawa, T., Kamei, Y. & Fukamachi, S. Protanopia (red color-
- 1996 blindness) in medaka: A simple system for producing color-blind fish and testing their spectral
- 1997 sensitivity. *BMC Genet.* **18**, 10 (2017).

- 1998 112. Nanda, I., Hornung, U., Kondo, M., Schmid, M. & Scharl, M. Common spontaneous sex-
- 1999 reversed XX males of the medaka *Oryzias latipes*. *Genetics* **163**, 245–251 (2003).
- 2000 113. Matsuda, M. *et al.* *Oryzias curvinotus* has *DMY*, a gene that is required for male development in
- 2001 the medaka, *O. latipes*. *Zoolog. Sci.* **20**, 159–161 (2003).
- 2002 114. Shinomiya, A. I., Kato, M., Yaezawa, M., Sakaizumi, M. & Hamaguchi, S. Interspecific
- 2003 hybridization between *Oryzias latipes* and *Oryzias curvinotus* causes XY sex reversal. *J. Exp.*
- 2004 *Zool. Part A Comp. Exp. Biol.* **305**, 890–896 (2006).
- 2005 115. Horie, Y. *et al.* Androgen induces gonadal soma-derived factor, *Gsdf*, in XX gonads correlated to
- 2006 sex-reversal but not *Dmrt1* directly, in the teleost fish, northern medaka (*Oryzias sakaizumii*).
- 2007 *Mol. Cell. Endocrinol.* **436**, 141–149 (2016).
- 2008 116. Hara, S., Sawamura, R. & Kitano, T. Cortisol induces masculinization of XX medaka through
- 2009 gonadal soma-derived growth factor (GSDF) and anti-Müllerian hormone receptor type 2
- 2010 (AMHR2). *Fish. Sci.* **87**, 85–91 (2020).
- 2011 117. Hara, S., Furukawa, F., Mukai, K., Yazawa, T. & Kitano, T. Peroxisome proliferator-activated
- 2012 receptor alpha is involved in the temperature-induced sex differentiation of a vertebrate. *Sci. Rep.*
- 2013 **10**, 11672 (2020).
- 2014 118. Koyanagi, M., Takada, E., Nagata, T., Tsukamoto, H. & Terakita, A. Homologs of vertebrate
- 2015 *Opn3* potentially serve as a light sensor in nonphotoreceptive tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*

- 2016 A. **110**, 4998–5003 (2013).
- 2017 119. Nayak, G. *et al.* Adaptive thermogenesis in mice is enhanced by Opsin 3-dependent adipocyte
2018 light sensing. *Cell Rep.* **30**, 672-686.e8 (2020).
- 2019 120. Hang, C. Y., Kitahashi, T. & Parhar, I. S. Neuronal organization of deep brain opsin
2020 photoreceptors in adult teleosts. *Front. Neuroanat.* **10**, 48 (2016).
- 2021 121. Nakane, Y., Shimmura, T., Abe, H. & Yoshimura, T. Intrinsic photosensitivity of a deep brain
2022 photoreceptor. *Curr. Biol.* **24**, R596–R597 (2014).
- 2023 122. Byun, J. H. *et al.* Gene expression patterns of novel visual and non-visual opsin families in
2024 immature and mature Japanese eel males. *PeerJ* **8**, e8326 (2020).
- 2025
- 2026