

野生メダカの海水順応

Adaptation to sea water of wild Medaka populations

日高 健太¹・小西 吟知¹・堀 翔悟¹・齊藤 修^{1,2}

¹長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・アニマルバイオサイエンス学科

²長浜バイオ大学ゲノム編集研究所

Kenta Hidaka¹, Ginji Konishi¹, Shogo Hori¹, Osamu Saitoh^{1,2}

¹Department of Animal Bio-Science, Faculty of Bio-Science, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

²Genome Editing Research Institute, Nagahama Institute of Bio-Science and Technology

要旨

日本のメダカは、淡水魚でありながら高い海水順応能力を示すことが知られている。そこで、そのメダカの海水順応の仕組みと浸透圧センサーの同定・機能解明を進めていく上で重要な基礎情報として、海水順応能力にメダカの「種、系統、生育環境」による違いがあるかどうか検討を試みた。野外から採集してきてきたメダカとミナミメダカ、更に市販のヒメダカを一定期間同じ環境で飼育し、DNA レベルで種を確定した上で、海水順応能力を比較した。結果、3集団の海水順応能力に違いがあることが見出された。

A Japanese ricefish, medaka, is known to have relatively high adaptability to sea water (SW). In order to start the study on the mechanisms for the osmoregulation and the adaptation to SW in medaka, we examined the survival rates in fresh water, 50% SW, 75%SW, and SW of wild populations of *Oryzias latipes* and *O. sakaizumi*, and a commercial variety (himedaka). Results indicated the apparent difference in adaptability to high environmental salinity among them.

1. はじめに

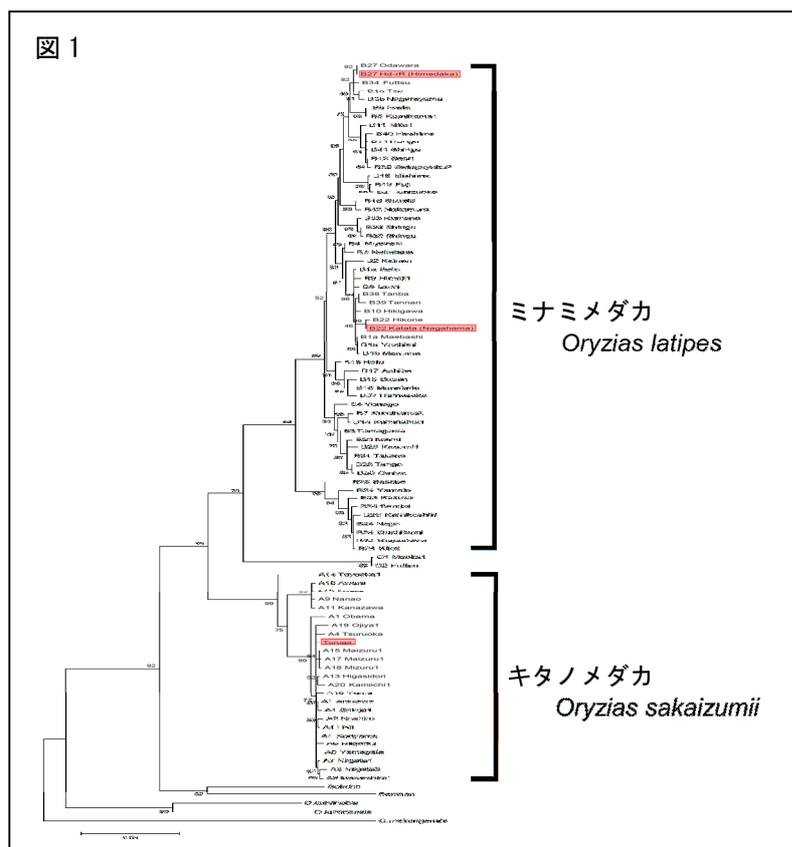
一般に真骨魚類の体液浸透圧は、淡水魚・海水魚を問わず約 300 mOsm/kg 程度の一定に調節されている。即ち、それぞれの水環境で、内分泌系の制御の下で鰓・腸・腎臓といった浸透圧調節器官が協調的に働き、体液の浸透圧恒常性が維持されている。前述の内分泌系自体を制御する上で最も重要な浸透圧モニタリングの機構については近年まで殆ど解明されていなかったが、分子生物学的手法の発展とほ乳類 TRP 研究の進展から、魚類での浸透圧センサーの候補としては、TRPV4 と TRPV1 が考えられ研究が進められている^{1)–5)}。これらの魚類浸透圧制御の機構解明のモデルとして、特に広塩性魚類のメダカは、ゲノム解析が終了⁶⁾してこともあり大いに注目される。

メダカは、体長 3.5 cm 程度の小型魚類で、流れの穏やかな小川や田んぼわきの用水路などに生息している。分布は、アジアに限定しており、特に日本国内では、北海道を除く全国各地に生息し、遺伝

系統的には「本州の日本海側・東北・北陸地方に生息する北日本集団」と「本州の太平洋側・中国地方・四国・九州・南西諸島に生息する南日本集団」と大きく2系統が示されていたが⁷⁾、その後これは、キタノメダカとミナミメダカに種分類された⁸⁾。一方で前述のように、メダカは主には淡水だが、稀には汽水にも生息しており、高い海水への順応性（広塩性、耐塩性）を持つことが知られている。実際にメダカを直接海水に入ると死亡するが、1/2海水で24時間順化後は海水で生育可能であることが実験的に示されている^{9)、10)}。これらの研究では、キタノメダカの近交系のHNIとミナミメダカのヒメダカ系統のd-rRが用いられていた。しかし、我々が、ミナミメダカ・ヒメダカ系統のd-rR系統とcab系統を直接海水に入れ調べたところ、d-rRは確かに死亡したが、cabは生存可能であることが観察された。これらの知見は、メダカは高い海水順応能力を示すものの、その能力には「種、系統、生育環境」による違いがあることを示しているのかもしれない。今後、メダカの海水順応の仕組みと浸透圧センサーの機能を調べていく上では、この観点は極めて重要な基礎情報である。

そこで本研究では、まず野外から採取してきてキタノメダカとミナミメダカ、更に市販のヒメダカを一定期間同じ環境で飼育し、DNAレベルで種を特定した上で、海水順応能力を比較することにした。

2. キタノメダカ、ミナミメダカ、ヒメダカの種特定

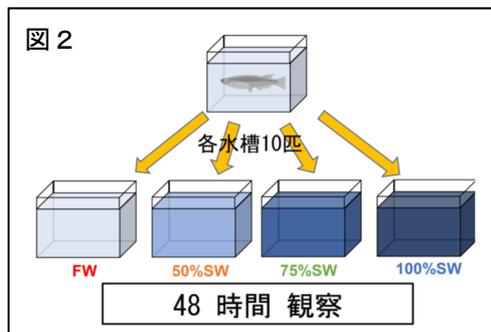


キタノメダカは、福井県敦賀市の余座と藤ヶ丘町の間を流れる田んぼ横の用水路から採集した。また、ミナミメダカは、滋賀県長浜市田村町の短大横の用水路から採集した。ヒメダカは、株式会社MASUKOから購入した。これらメダカの種を確定するため、3集団からそれぞれ3個体を選び、以前に報告されたプライマー⁷⁾を用いてミトコンドリアDNAのシトクロームb遺伝子をPCR増幅し、その1141塩基対の配列を決定した。すると、各集団由来の3個体は、それぞれ全く同一の配列であった。そこで、次にこれら3集団の3配列を、これまでに報告されている複数のキタノメダカとミナミメダカのシトクロームb配

列と比較した。24種のキタノメダカ、58種のミナミメダカ、2種の関東集団のメダカ、更にハイナンメダカ、ルソンメダカ、メコンメダカの各シトクロームb配列を加えて最尤法の系統樹を作成して解析した（図1）。結果、敦賀市余座・藤ヶ丘町のメダカ集団はキタノメダカであり、長浜市田村町の集

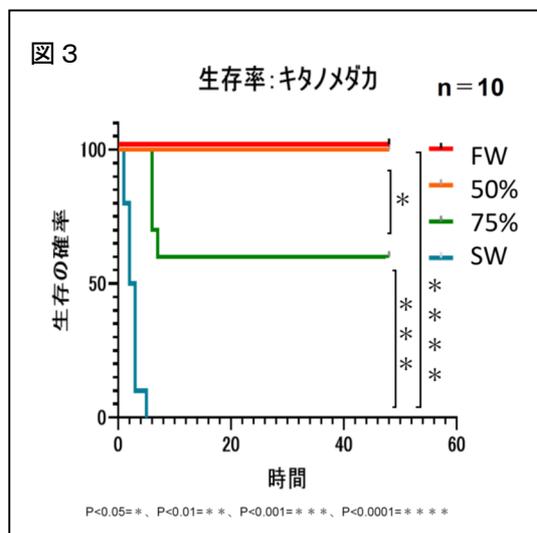
団はミナミメダカ（滋賀県堅田の配列と一致）、さらに購入したヒメダカ集団はミナミメダカであり、特にミナミメダカのヒメダカ系統 d-rR と完全一致した。

3. キタノメダカ、ミナミメダカ、ヒメダカの海水順応能力

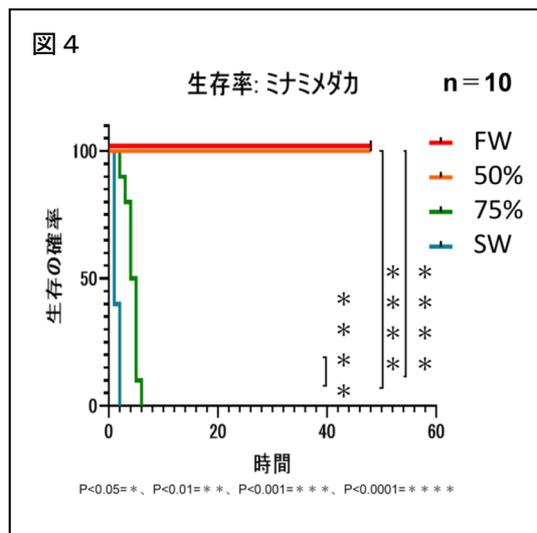


前述の検討で種を特定した敦賀市のキタノメダカ集団、長浜市のミナミメダカ集団、更に市販のヒメダカ集団について、どの程度の海水順応能力があるのか、比較を行った。水道水のカルキ抜きしたものを淡水（Fresh Water, FW）として、これを用いて GEX 人工海水 SEA water を溶かし 50%、75%、100%の海水（Sea Water, 50%SW, 75%SW, SW）を作成し実験に使用した。約 500 ml の FW、

50%SW、75%SW、SW の入った 4 水槽を作り、それぞれの水槽に各集団から無作為に選んだ 10 匹ずつを入れ、各水槽での生存数を 48 時間観察した（図 2）。本研究で用いたキタノメダカは、SW 中では 5 時間で全滅したが、75%SW 中では半数以上が生き残り、50%SW 及び FW では全く死亡するメダカは出現しなかった。



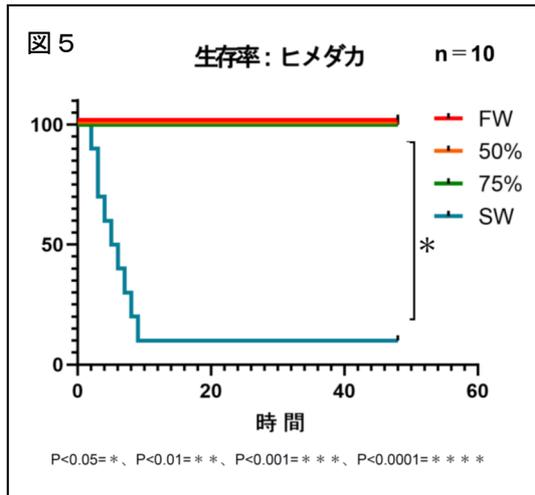
ログランク (Mantel-Cox) 検定で比較すると、FW と SW、FW と 75%SW、更に 75%SW と SW の生存率の違いは統計的に有意な違いと判断された（図 3）。一方、ミナミメダカで同じ実験を行うと、SW 中で 2 時間で全滅し、75%SW 中では 6 時間で全滅した。しかし、文献 9), 10) 通り 50%SW では、FW と同様に全く死亡するメダカは出現しなかった。



ミナミメダカでも、キタノメダカ同様にログランク (Mantel-Cox) 検定で比較すると、FW と SW、FW と 75%SW、更に 75%SW と SW の生存率の違いは統計的に有意な違いと判断された（図 4）。キタノメダカとミナミメダカで 75%SW での生存率が明らかに異なることが興味深い。次にヒメダカについて同じ生存実験を行った。すると、SW 中で 9 時間で 9 匹が死亡したが 1 匹は 48 時間生存し続けた。しかも、75%SW と 50%SW は、FW と全く同様に死亡するメダカは出現しなかった。また、ログランク (Mantel-Cox) 検定で比較すると、FW と SW の生存率の違いは統計的に有意な違いと判断された（図 5）。以上のように、本研究に使用したヒメダカは海水順応性が極めて

高く、特にやはり 75%SW 中での生存率が他の 2 種の野生メダカと異なると考えられた。

以上の研究から、予備的ではあるが、同じメダカでも、野生のキタノメダカ・野生のミナミメダ



カ・市販のヒメダカで海水順応能力に大きな差があることが分かった。特に 75%SW での生存率が大きく違うように考えられた。まず、同じ野生種でもミナミメダカとキタノメダカにおいて海水順応能力の差が確認され、キタノメダカが海水順応性が高いと思われた。この違いが、種間で異なる性質なのか、それとも生息場所への適応により生まれたものなのかは、今回の研究では追求できなかった。ただ、ミナミメダカは採集した地点は淡水の琵琶湖のすぐ近くであったが、キタノメダカを採集した地点は比較的海に近い地点であった。もしかしたら、今回実験に使用したキタノメダカは、多少の塩水経験のある個体群を用いていた可能性

があるかもしれない。今後は、まず他の生息場所由来の複数のキタノメダカとミナミメダカを比較することが必要である。更に、研究室内でそれぞれを飼育して世代を経ても現在の海水順応の特性が受け継がれるかを、今後検討する必要がある。また、ミナミメダカとヒメダカに関しても野生種と系統ではあるが、種としては同じミナミメダカにもかかわらず海水順応能力に大きな差が確認された。即ち、明らかにヒメダカの方が海水への順応能力が高かった。例えば、系統化される過程で何かがきっかけで浸透圧調節の特性が変化したなどの可能性が考えるかもしれない。

いずれにしてもこれらのメダカ集団の海水順応特性の違いを利用すれば、メダカの浸透圧調節の仕組みや浸透圧センサーの実体解明にアプローチ出来る高い可能性があり、今後より詳細な検討を進めていきたい。

参考文献

- 1) Bossus, M., Charmantier G., Lorin-Nebel, C. Transient receptor potential vanilloid 4 in the European sea bass *Dicentrarchus labrax*: A candidate protein for osmosensing. **Comp. Biochem. Physiol. A** 160, 43-51, (2011)
- 2) Watanabe, S., Seale A. P., Grau, E. G., Kaneko, T. Stretch-activated cation channel TRPV4 mediates hyposmotically induced prolactin release from prolactin cells of mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** 302, R1004-1011, (2012)
- 3) Seale, A. P., Watanabe, S., Breves, J. P., Lerner, D. T., Kaneko, T., Grau, E. G. Differential regulation of TRPV4 mRNA levels by acclimation salinity and extracellular osmolality in euryhaline tilapia. **Gen. Comp. Endocrinol.** 178, 123-130, (2012)
- 4) Hori, S., Sakamoto, N., Saitoh, O. Cloning and functional characterization of medaka TRPV4. **Comp. Biochem. Physiol. A.**, 267, 111182 (2022)
- 5) 浅野 麻己子、竹花 佑介、齊藤 修. ゲノム編集によるメダカ TRP の機能解明 -TRPV1b ノックアウトメダカ作成の試み-. **長浜バイオ大学・ゲノム編集研究所紀要** 1, (2021)
- 6) Kasahara, M., Naruse, K., Sasaki, S. et al. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. **Nature** 447, 714- 719, (2007)
- 7) Takehana, Y., Nagai, N., Matsuda, M., Tsuchiya, K., Sakaizumi, M. Geographic variation and diversity of the cytochrome b gene in Japanese wild populations of medaka, *Oryzias latipes*. **Zool. Sci.** 20, 1279-1291, (2003)

- 8) Asai T., Senou H., Hosoya K. *Oryzias sakaizumii*, a new ricefish from northern Japan (Teleostei: Adrianichthyidae) , **Ichthyol. Explor. Freshwaters** 22, 289-299, (2011)
- 9) Inoue, K., Takei, Y. Diverse adaptability in *Oryzias* species to high environmental salinity. **Zool. Sci.** 19, 727-734, (2002)
- 10) Miyanishi, H., Inokuchi, M, Nobata, S., Kaneko, T. Past seawater experience enhances seawater adaptability in medaka, *Oryzias latipes*. **Zool. Lett.** 2, 12, (2016)

謝辞

本研究は、長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・アニマルバイオサイエンス学科の動物分子生物学研究室の多くの方々の協力の下に行われた。

また、本研究には、「組換えDNA実験」に該当する実験は含まれていない。