

学 位 論 文 題 名

Studies on the Expression of Stress Protein 70  
by Psychogenic Stress in Goldfish, *Carassius auratus*.

(キンギョの精神的ストレスに伴うストレスタンパク質の発現に関する研究)

学位論文内容の要旨

生物は絶えず変動する環境下で様々なストレスを受けており、それらに対して種々の応答を示す。水産増養殖では、輸送、捕獲および混み合いなどによるストレスが、魚類の成長率、摂餌率および免疫抵抗力の低下を引き起こすことから、魚類におけるストレス応答に関する研究が不可欠である。これまで、高温条件下、重金属存在下、低酸素状態またはハンドリングなどの物理的および化学的ストレスに対する応答に関する多くの研究が、魚類、爬虫類および哺乳類など多くの種で行われてきた。なかでも、ストレス時に細胞内で一過性に発現するストレスタンパク質（Heat shock protein; HSP70）の増加や血中コーチゾル濃度の上昇は、ストレス応答の指標として広く用いられている。HSP70にはストレス起因性と常在性の2種があり、いずれもタンパク質の変性を防ぐと共に膜透過を可能にする機能を有する。また血中コーチゾル濃度の上昇は、ストレス回避に必要となるエネルギー代謝に不可欠な肝臓における糖新生を促進する。

一方、これら物理的および化学的ストレスに加え、魚類は弱肉強食の生態環境に棲んでおり、補食者に遭遇した場合など、極度の精神的ストレスを受けることが考えられる。しかし、魚類を用いて、このような精神的ストレスに対する応答に関して調べた研究は未だない。

そこで本研究では、小型で雑食性のブルーギル (*Lepomis macrochirus*) とキンギョ (*Carassius auratus*) との混合飼育を行い、キンギョにおける精神的ストレスに対する応答の指標について検討するため、次の4項目について調べた。

I. 精神的ストレスに伴う HSP70 の発現

本章ではキンギョ（平均体重 20g）とブルーギル（平均体重 120g）の混合飼育

に伴い、キンギョの諸器官に HSP70 が発現するか否か調べた。キンギョおよびブルーギルは、別々の水槽にて 20°C で 2 週間馴化後、次の 4 実験に供した。実験 1 : 1 つの水槽でキンギョとブルーギルを混合飼育した。実験 2 : 網で仕切った 1 つの水槽を用いて、キンギョがブルーギルを視覚および嗅覚によって認知できるが、直接ブルーギルに攻撃されることのない条件下で飼育した。実験 3 : ブルーギルの水槽中に透明なキンギョの水槽を置き、キンギョがブルーギルを視覚によってのみ認知できる条件下で飼育した。実験 4 : キンギョの水槽とブルーギルの水槽間を暗幕で仕切り、飼育水を循環させ、キンギョがブルーギルを嗅覚によってのみ認知できる条件下で飼育した。実験開始 6 および 12 時間後にキンギョの脳、肝臓、心臓、腎臓および筋肉を摘出し、HSP70 の発現についてウエスタンブロットにより調べた。実験 1 において、HSP70 の発現は脳および肝臓で認められたが、心臓、腎臓および筋肉では認められなかった。また肝臓における HSP70 の発現量は両群間で差は認められなかったため、以後の実験は脳のみを分析対象とした。実験 1 および 3 では、6 および 12 時間後の脳における HSP70 の発現量が、対照群と比べ有意に増加した。さらに、実験 1 で 6 時間混合飼育したキンギョの脳における HSP70 の局在について免疫組織化学的手法により調べた結果、HSP70 は特に視覚に関与する視葉および味覚や運動中枢に関与する迷走葉に強く発現していた。実験 2 では、6 時間後における HSP70 の発現量が、対照群と比べ有意に増加した。実験 4 では、HSP70 の発現量は両群間で差はなかった。以上のことから、キンギョはブルーギルとの混合飼育によって精神的ストレスを受け、特に脳で HSP70 が発現することが分かり、HSP70 の発現が精神的ストレス応答の指標となることが示された。またこの際、ブルーギルの姿や動きを視覚で認知することが主なストレス要因となっていることが示唆された。

## II. 精神的ストレスに伴う HSP70 mRNA の発現

前章で精神的ストレス応答の指標として示した HSP70 の発現がストレス起因性であることをより明確にするため、本章では、ストレス起因性の HSP70 の cDNA を用いて、前章で述べた 4 実験と同様の条件下で飼育したキンギョの脳の HSP70 mRNA の発現についてノーザンブロットにより調べた。その結果、すべての実験条件下で、脳における HSP70 mRNA の発現は、前章で述べた HSP70 の

発現と同様の変動を示した。このことから、ブルーギルとの混合飼育による精神的ストレスによってキンギョの脳で発現する HSP70 は、ストレス起因性のものであることが分かり、HSP70 mRNA の発現も HSP70 と同様、精神的ストレス応答の指標となることが示された。

### III. 精神的ストレスに伴う血中コルチゾル濃度の変化

本章では、ブルーギルとの混合飼育による精神的ストレスを与えたキンギョの血中コルチゾル濃度について調べた。キンギョは第 I および II 章と同様の実験 1-4 の条件下で飼育した後採血し、血中コルチゾル濃度を ELISA により測定した（実験 2 については 2 時間後も測定）。実験 1 および 3 では、6 および 12 時間後の血中コルチゾル濃度が対照群と比べ上昇した。実験 2 では、2 時間後の血中コルチゾル濃度が対照群と比べ上昇し、その後対照群レベルまで低下した。実験 4 では、血中コルチゾル濃度に両群間で差はなかった。以上の結果から、血中コルチゾル濃度も HSP70 と同様、ブルーギルを視覚で認知することによる精神的ストレス応答の指標となることが示された。

### IV. 精神的ストレス時の脳における HSP70 発現と血中コルチゾルとの関係

一般に血中コルチゾル濃度の上昇は、視床下部からの副腎皮質刺激ホルモン放出因子（CRF）の分泌、次に下垂体からの副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）の分泌、次いで副腎皮質からのコルチゾルの分泌といった一連の内分泌反応系により引き起こされる。第 I-III 章で、ブルーギルとの混合飼育による精神的ストレスに伴い、キンギョの脳における HSP70 の発現と血中コルチゾル濃度が共に増加することを述べたが、これら 2 つのストレス応答間に相互関係があるか否か不明である。本章では、血中コルチゾル濃度を薬理的に変化させることによって、脳の HSP70 発現と血中コルチゾル濃度との相互関係について調べた。コルチゾル濃度の上昇促進剤として CRF またはコルチゾルを投与したキンギョでは、ストレスを与えなくとも血中コルチゾル濃度が上昇し、HSP70mRNA の発現も増加した。次に、コルチゾル濃度の上昇阻害剤として CRF および ACTH 分泌阻害剤であるベタメタゾンまたはコルチゾル合成酵素阻害剤であるメチラボンを投与後、同一水槽でブルーギルと 6 時間混合飼育したキンギョでは、血中コルチゾル濃度の上昇および HSP70mRNA の発現増加は認められなかった。こ

これらのことから、精神的ストレスに伴う脳の HSP70mRNA の発現増加は、血中コルチゾール濃度の上昇によって引き起こされると考えられた。

以上の結果から、キンギョはブルーギルとの混合飼育によって精神的ストレスを受け、脳の HSP70 および HSP70 mRNA の発現ならびに血中コルチゾール濃度が増加することが分かり、これらが精神的ストレス応答の指標となることが示された。さらにこのような精神的ストレスは、混合飼育した他魚種を主に視覚で認知することにより、引き起こされることが示唆された。また、精神的ストレス時の脳における HSP70 および HSP70 mRNA の発現増加には、血中コルチゾールの増加が深く関与することが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 麦 谷 泰 雄  
副 査 教 授 山 内 皓 平  
副 査 助 教 授 清 水 幹 博

学 位 論 文 題 名

## Studies on the Expression of Stress Protein 70 by Psychogenic Stress in Goldfish, *Carassius auratus*.

(キンギョの精神的ストレスに伴うストレスタンパク質の発現に関する研究)

魚類の増養殖では、輸送、捕獲、混み合いなどに伴うストレスが成長率、摂餌率および免疫抵抗力の低下を引き起こすことから、魚類のストレス応答に関する研究は重要である。従来、水温や容存酸素の変動、またはハンドリングなど物理・化学的ストレスに対する応答に関する生理・生化学的研究は多数行われてきた。しかし魚類は弱肉強食の生態環境に棲んでおり、捕食者に遭遇した場合など極度の精神的ストレスを受けることが考えられる。しかし魚類の"精神的ストレス"に関する研究分野は未知の領域であり、精神的ストレスと生体の応答反応を調べた研究は未だない。本研究は、捕食者対被捕食者の関係を利用して、被捕食者に精神的ストレスを与え得ることを示し、それに伴う生体の応答反応を生理的、生化学的レベルで解析したものである。得られた研究結果の概要は下記の通りである。

1. キンギョ（被捕食者）とブルーギル（捕食者）を4つの異なる条件（①仕切のない1個の水槽での混合飼育、②網で仕切った1つの水槽のそれぞれのコンパートメントでキンギョとブルーギルを別々に飼育、③キンギョの入っている透明な水槽をブルーギルの入っている大型水槽に設置、④両魚を別々の水槽で飼育し、お互いの視覚を遮り、飼育水のみを循環した場合）で6時間または12時間混合飼育することにより、キンギョに精神的にストレスを与えることが可能であった。

2. この場合、キンギョは視覚により捕食者を認識し、血中コーチゾール濃度が顕著に上昇し、脳のHSP70（ストレスタンパク質）およびHSP70mRNAの発現

が増加した。臭覚は関与していなかった。

3. また混合飼育によりキンギョの脳の視蓋にHSP70が強く発現していることを免疫組織化学により示した。

4. 脳以外に、肝臓、心臓、腎臓および筋肉についても調べたが、精神的ストレスに伴うHSP70の発現増加は認められなかった。

5. 血中コーチゾールの変動とHSP70mRNAの発現に強い相関が認められたので、両者の生体内での関係を明らかにするために、副腎皮質刺激ホルモン放出因子またはコーチゾールをキンギョに投与し、血中コーチゾールを人為的に上昇させる実験を行った。その結果、ストレス負荷のない条件下でも脳のHSP70mRNAが増えた。

6. 反対に、コーチゾールの合成・分泌を阻害する薬物（ベタメタゾンまたはメチラポン）を投与することにより、混合飼育に伴うストレス負荷後も脳のHSP70mRNAの発現増加は認められなかった。

以上の結果は、魚類も精神的にストレスを感知することを初めて示したものであり、その際捕食者の姿や動きを視覚で認知することが主なストレス要因になっていることを明らかにした。また、血中コーチゾール、HSP70mRNA およびHSP70は魚類の精神的ストレス応答の指標となり得ることを示した。さらにこの場合、コーチゾールがストレス応答の一義的役割を果たしていることを明らかにした。このような成果は魚類のストレスに関する研究分野に新知見をもたらすものであり、審査員一同は申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格のあるものと判定した。