

東京大学大学院新領域創成科学研究科

先端生命科学専攻

平成29年度

修士論文

メダカ活動に概日性リズムがみられる条件の検討

— 明暗と給餌周期に着目して —

2018 年 1 月 提出

指導教員 尾田 正二 准教授

三谷 啓志 教授

47-166348 室井 和也

## 目 次

### < 要 旨 >

1. 序 論	1
1.1 恒暗環境下の動物にみられる概日性の活動リズム	
1.2 体内の概日時計を基盤に発現する給餌予知活動	
1.3 健康を維持したまま魚の活動を精密に評価する方法	
1.4 メダカ活動に概日性リズムがみられる条件の検討	
2. 方 法	7
2.1 実 験 動 物	
2.2 飼 育 環 境	
2.3 共通の実験環境	
2.4 個別の実験環境	
2.4.1 HPRT メダカ	
2.4.2 Hd-rR メダカ	
2.4.3 HNI メダカ	
2.4.4 加賀メダカ	
2.4.5 小坂井メダカ	
2.4.6 大館メダカ	
2.4.7 SK2 メダカ (1 回目)	

2.4.8	SK2 メダカ (2 回目)	
2.4.9	ゼブラフィッシュ	
2.5	実験中の観察	
2.6	活動の数値化	
2.7	移動平均の算出	
3.	結 果	16
3.1	明暗サイクルにおける活動性	
3.2	明暗サイクル下での明期開始前の活動性	
3.3	恒暗条件における活動性	
3.4	給餌周期と給餌予知	
3.5	絶食期間における活動性	
4.	考 察	19
4.1	水温と水質の安定性および魚の健康状態	
4.2	活動に概日性リズムがみられる条件	
4.3	夜行性動物と昼行性動物の活動制御・発現機構の差異	

< 謝 辞 >

< 引用文献 >

< 図表集 >

< 付録集 >

## 1. 序 論

### 1.1 恒暗環境下の動物にみられる概日性の活動リズム

原核生物から真核生物まであらゆる生物の生理機能や行動に概日性の活動リズムが観察される。生理機能や行動にみられる概日性の活動リズムは外界からの刺激を受けなくても約 24 時間の周期で発現量が自律的に振動する遺伝子群(概日時計)により制御されている(1, 2)。動物の場合、行動のリズムが他のリズムと比べて活発・不活発の区別が明確なことが多いため(3)、概日時計の機能評価を目的に、これまでにさまざまな種類の動物で行動(活動性)における概日性リズムの有無が調べられてきた(4, 5, 6)。ヒト (*Homo sapiens*) や哺乳類のモデル生物として広くさまざまな生物学実験に使われているハツカネズミ (*Mus musculus*, 以下マウスと略) の場合、恒常的な暗条件において、明暗条件下でみられていたのと同様な活動期と非活動期が 1 日のうちで明確に区別できる概日性の活動リズムが数ヶ月にわたり継続(フリーラン)する(3)。一方で、魚類ではあるが脊椎動物のモデル生物として利用されることも多いメダカ (*Oryzias latipes*) とゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) も、恒暗条件下で概日性の活動リズムがフリーランすると報告されている(7, 8, 9)。これらの報告には、メダカでは 5 日間、ゼブラフィッシュでは 10 日間、恒暗条件において概日性の活動リズムが継続したと示されているが、それ以降の結果は示されていないことから、それ以降も継続するかどうかは不明である。メダカとゼブラフィッシュ以外の魚では、淡水産のタラ (*Lota lota*) は 47 日間 (10)、北米大陸特産のコイ科の Lake Chub (*Couesius plumbeus*) は 1 ヶ月 (11)、Killfish (*Fundulus heteroclitus*) は 19 日以上 (12) と比較的長期にわたり恒常的な暗条件において概日性の活動リズムが継続(フリーラン)すると報告されているのに対

し、ナマズ (*Silurus asotus*) (13)、ドジョウ (*Misgurnus anguillicaudatus*) (14)、キンギョ (*Carassius auratus*) (15, 16)、ニジマス (*Oncorhynchus mykiss*) (17)では恒暗移行から数日から10日くらい経つと概日性の活動リズムが消失するか、恒暗移行直後から活動のリズムそのものが不明瞭で概日性のリズムが認められないと報告されている。このように、恒暗環境における魚類活動の概日性の活動リズムの継続性には大きな幅がある。

## 1.2 体内の概日時計を基盤に発現する給餌予知活動

毎日定刻に制限給餌される飼育動物は給餌2~3時間前から給餌時刻に向かって活動性が急激に増加する。これは、給餌予知活動 (food-anticipatory activity, FAA) とよばれている(3)。ラット (*Rattus norvegicus*) やマウスの FAA は、30時間や18時間といった非24時間周期の給餌では起こりにくく(18)、概日性の活動リズムが FAA として一端形成されると、絶食期間においても給餌中と同じ位相で数日間継続する(19)。このことから、FAA は体内の概日時計を基盤として発現する現象であると考えられている。ゼブラフィッシュやタイ (*Sparus aurata*) の活動にも24時間周期の給餌により FAA が認められたとする報告があることから(20, 21)、魚類においても概日時計を基盤として FAA が生じていると考えられている。このことから、概日性の活動リズムの発現には、明暗だけでなく24時間周期の給餌も大きく関与している。しかしながら、恒暗環境において魚類の概日性の活動リズムの継続性を調べた過去の実験には、給餌による影響を考慮していないものも多い。魚類の場合、自由摂食が困難なため、魚の健康を維持するためには毎日給餌する必要がある。これらの報告の中には毎日定刻に行った給餌により発現した FAA が含まれていた可能性も考えられる。

### 1.3 健康を維持したまま魚の活動を精密に評価する方法

一般に、小型魚類の活動リズムの測定には、水槽の任意の位置に取り付けた赤外線レーザーを通過した回数を記録する方法が用いられる。マウスやラットでは回転運動と床運動（足踏み運動）を記録する方法が用いられるが、リズムの明確さでは回転運動の方が優れており(3)、床運動と回転運動のリズムでは、同じ個体を用いても周期が回転運動の方が短いことが知られている(22)。このことから、小型魚類においても測定方法の違いにより概日性の活動リズムの恒暗下での継続性に差が認められる可能性もあると思われるが、同一魚種を異なる行動指標を用いて概日性の活動リズムを評価した知見はみあたらない。そこで、赤外線センサーを利用した従来の方法とは異なる方法を用いて、小型魚類の活動を評価し、得られた知見を過去のものと比較検討する必要があると考えられる。

さらに、魚類において概日性の活動リズムを検証した過去の実験の中には、測定中水質を安定的に良好な状態に維持できていたか疑わしいものも多い。例えば、狭い細胞培養ケースの中で1匹ずつ生体を飼育したり、水換えをしないまま高密度（例えば60L水槽に20匹）でゼブラフィッシュやメダカの成魚を約1ヶ月飼育しているケースも散見される(7, 8, 23)。状況にもよるが、通常、水槽で魚を飼育する場合、水換えをしないまま1週間以上水質を良好な状態に保ち、生体の健康状態を良好な状態に維持することは難しい。過去の報告には水質検査の結果が記載されていないため、実験中に水質の検査を行っていないものも多いと思われる。そのため、水質が悪化して生体の健康が悪化したことにより、活動全体が不活発になり、概日性の活動リズムがみられなくなった可能性も否定できない。実験時の水質が安定して良好に維持されていることは、魚類の行動実験においてと

でも大切なことであると考えられる。

所属研究室では、通常の 45 センチメートル水槽（約 60L）内で泳ぐメダカを赤外線付 CCD ビデオカメラで撮影し、フレーム毎にリアルタイムで遊泳位置を二次元的な数値データで記録することができる装置（「めだか de モニタ」 四国総合研究所、高松、以下 MDM と略)を利用して遊泳軌跡を数値化する実験系を開発している（図 1）。MDM は約 0.1 秒間隔でメダカの遊泳位置を定量化できる高い時間分解能をもつことから、従来の赤外線レーザーを用いた方法よりもより高い精度で活動を評価することができるかと期待される。これまでに、この MDM を用いてメダカ 6 匹程度の遊泳軌跡が 24 時間明暗サイクル下で約 1 週間追跡され、記録された全個体の遊泳軌跡データの解析から、明期に活発に活動し、暗期に不活発になる昼行性の明瞭な概日性の活動リズムの検出に成功している(24)。さらに、MDM が生産する膨大なデータの取扱いと解析方法が改善されたことにより、約 2 ヶ月間の長期にわたる行動追跡が可能になった(25)。また、実験水槽をメダカやゼブラフィッシュなどの小型魚類の大規模飼育に用いる集合水槽（名東水園製）に付属する大容量（約 200L）の濾過装置にポンプを用いて接続して、大量の飼育水を循環させることにより、長期間水質を悪化させることなく行動を測定することができる（図 2）。さらに、MDM は魚の大きさに合わせて追跡する個体サイズのパラメータを任意に決めることができるため、メダカだけでなくさまざまな小型魚類の行動解析へ利用が期待できる。

#### 1.4 メダカ活動に概日性リズムがみられる条件の検討

これまでに、MDM を用いたメダカの行動解析により、恒暗条件に移行するとその直後から活動が一貫して不活発となり、恒暗条件下では活動における概日性リズムが完全に消失するメダカ系統（大館）と大館とは反対に微弱な概日性の活動リズムが約 2 週間継続する系統（SK2）が見出されている（25）。この差異の原因は、系統間の差異である可能性が考えられるが、いずれも一度のみの試行結果であることから、再現性が確認されておらず、個体差等を含む試行による差異である可能性も否定できない。

そこで本研究は、恒暗条件下で活動の概日性リズムが完全に消失する特徴が大館メダカ特異的なものであるのか、それともメダカに共通する特徴であるのかを検証することを第一の目的とした（検証 I）。また、第二の目的として、メダカにおける FAA の検出を試みた。

具体的には、さまざまなメダカ系統の行動を光環境（24 時間明暗サイクル、恒暗、恒明）および給餌周期（8 時間、24 時間、30 時間、絶食）をさまざまに設定した条件下で MDM により測定し、メダカ活動における概日性リズムの発現と FAA の出現の有無を検証した。そこで得られた結果が既に報告されているゼブラフィッシュのものと大きく異なっていたことから、ゼブラフィッシュについてもメダカと同様の検証（検証 I・II）を行った。これらの検証を通して、メダカとゼブラフィッシュにおける活動と概日時計との関連性を検討した。

なお、活動性の指標には活動のより直接的な指標である移動速度を用いた。本研



究では MDM が記録したメダカの遊泳軌跡を記録した位置データから速度を算出し、算出した遊泳速度を指標に活動を評価した。また本研究では、健康な個体のデータを取得し、より確度の高い活動の評価を目指した。そのために測定中の水温と水質を随時チェックし、安定的に水温と水質が維持できていたかを確認した。MDM は PC のモニタ越しに魚が遊泳する様子をリアルタイムで観察できるため（図 1）、撮影中の動画を適時確認しながら、不健康な個体の有無の把握にも努めた。

## 2. 方法

### 2.1 実験動物

東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻動物生殖システム分野において継代飼育しているメダカ (*Oryzias latipes*) の成魚 (体長約 3cm) および近隣のペットショップ (DCM ホーマック野田みずき店) で購入したゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) の成魚 (体長約 5cm) の行動を測定した。行動測定に用いたメダカは、代表的な近交系として、全ゲノム配列が決定され分子生物学実験・遺伝学実験に頻用されているミナミメダカ由来の近交系 Hd-rR、キタノメダカ由来の近交系 HNI、色素輸送ができず体躯が透明な SK2、SK2 の一部遺伝子を改変した HPRT、数十年前に各地から採取し本学柏キャンパス構内の屋外メダカ飼育場 (図 3) で継代維持されている野生集団から加賀 (石川県)、小坂井 (愛知県)、大館 (秋田県) を用いた (図 4)。なお、HPRT は DNA 損傷の回復経過を組織レベルで可視化するために作製された系統であり (27)、改変した遺伝子による行動や概日リズムに対する影響はなく、SK2 と同じ行動を示すことが期待される。また、野生集団の加賀と小坂井は先行研究で概日リズムのフリーランが一切認められなかった大館の対照として多数の野生集団から任意に選定した。

### 2.2 飼育環境

測定を行う前は、東京大学柏キャンパス新領域生命棟 1N06 内にある摂氏 26 度に設定した恒温室に設置した循環式集合水槽 (名東水園製) に置いた幅 15cm 奥行き 20cm 深さ 10cm のプラスチック製のタンクで、4 匹から 8 匹程度の個体を系統

ごとに、14 時間明期：10 時間暗期（09:00 時点灯、23:00 時消灯）の照明サイクル下にて 2 ヶ月以上飼育した（図 3）。飼育中は、食餌の様子をよく観察しながら数分間で食べきれぬ量の餌を 1 日 2 回人の手で与えた。1 回目は 9~10 時にブラインシュリンプ（*Artemia franciacana*）と市販の粉餌おとひめ B1（日清丸紅飼料）、またはメダカの口に入る大きさに粉末状にした金魚用粉餌テトラフィン（テトラ社、ドイツ）を与えた（図 3）。2 回目は 16~17 時に粉末餌のみを与えた。毎日産卵するメダカが居住するタンクから健康と判断した 4~8 匹（雌雄同数）を選んで実験に供した。個体の取り扱いは東京大学動物実験実施規則（付録 1）に従った。

### 2.3 共通の実験環境

摂氏 26 度に設定した部屋に置かれた自作暗室(25)内に 60L 水槽(幅 45cm、高 30cm)を設置し、その水槽に約 200L の飼育水を循環させることができる大容量の生物濾過槽（名東水園製）を繋ぎ、飼育水を循環させた（図 1, 2）。小さな穴がたくさんある仕切り板を用いて、水槽内に奥行き 5cm、幅 45cm、深さ 40cm の縦長のスペースを作り、そのスペースに魚を遊泳させた（図 1）。熱帯魚飼育用の LED 照明（LED フラット 45、コトブキ製）を照明として使用した（図 5A）。水槽内照度を照度計（Lux Meter AR813A, アズワン）を用いて計測し、照明点灯時 2,000 ルクス、消灯時 0 ルクスであった（図 2F）。給餌によって人為的な刺激をメダカに与えることを極力避けるため、給餌は自動給餌器（エーハイム製）を用いて行った（図 5A, 5B）。

摂氏 26 度に設定したヒータを濾過槽に取り付け水温を維持し、ボタン電池様の水温記録データロガー（KN ラボラトリーズ）を用いて 1 時間毎に水温を計測した

(図 5D)。暗室内の温度が高まりやすい夏季には、サーキュレーター (05CN01367, アイリスオーヤマ製) を用いて暗室内に風を送り、水温の上昇を防ぐ工夫をした (図 5C)。夏季以外は室温や水温がよく安定していたため水温記録データロガーによる水温の計測は行わず、濾過槽に取り付けた水温計の値を適時記録し、著しい水温変動の有無を確認した。実験中に計測した水温の結果を付録図 1~7、付録表 1, 2 に示した。多少の変動はみられたが、活動を大きく変化させることが予想されるような急激な温度変化 (摂氏 5 度以上) はなく、メダカとゼブラフィッシュの健康を害する可能性があるような極端な低・高水温も計測されなかった。ゼブラフィッシュの行動測定中に、測定日の前半と中盤および後半でおよそ摂氏 4 度の水温差が認められた。測定 7, 8 日目の水温低温群 (摂氏 25.0 度)、測定 2, 4 日目の水温中温群 (摂氏 26.5 度)、測定 27, 28 日目の水温高温群 (摂氏 28.5~29.1 度) の 3 群における明期の遊泳速度を比較したところ、3 群間で大きな違いは認められなかった (低温群 69.0 ミリメートル毎秒、中温群 68.2 ミリメートル毎秒、高温群 66.8 ミリメートル毎秒)。

水質悪化を防ぐため、ろ過バクテリアが定着しやすいセラミック製の石 (メダカ・ストーン、水作) を水槽に入れた (図 5E)。酸素の供給と水槽内の水の循環を促すため、エアレーション (水作エイト M、水作) を行った。飼育水を循環させるポンプには殺菌灯を取り付け、藻や雑菌の繁殖を抑える工夫をした (図 5G)。PACKTEST (共立理化学研究所) を用いて、アンモニウムイオン濃度、亜硝酸イオン濃度、硝酸イオン濃度をそれぞれ随時測定し、水質のチェックを行った (図 5H)。実験中にチェックした水質の結果は付録表 3~11 に示した。有害なアンモニウムイオンが一時的に検出されることはあったが、健康への悪影響が懸念される長期の水質悪化は起こらなかった。アンモニウムイオンが一時的に比較的高い

濃度で検出された日の活動性も他の日と同様であり（HPRT 測定時；一貫して明期の遊泳速度は 25 ミリメートル毎秒程度）、また異常行動も認められなかったことから、一時的な水質悪化が活動性に与える影響は極めて小さいと考えられる。

## 2.4 個別の実験環境

全部で 9 回の行動測定を行った。それぞれの測定時の状況（生後月齢、系統名、個体数（雌雄の数）、測定日数、明暗条件、給餌周期、測定期間）は以下の通りである。

### 2.4.1 HPRT メダカ

生後 4 ヶ月の HPRT メダカ 4 匹（オス 2 匹、メス 2 匹）の行動を 9:00 に点灯して 23:00 に消灯する明暗条件（14:10 LD）下で 30 日間測定した。給餌は、測定 1~9 日目は明期の間（mid-light）の 16:00 に、測定 10~17 日目は暗期の間（mid-night）の 4:00 に、測定 18~25 日目は明期開始と同じ時刻の 9:00 に行った。測定 26~30 日目およびデータは未計測であるが測定 31~45 日目は 9:00 時の粉餌の自動給餌の後に毎日 1 回ブラインシュリンプを与えた。測定は 2017 年 10 月 23 日から 2017 年 11 月 21 日に行った。

### 2.4.2 Hd-rR メダカ

生後約 6 ヶ月の Hd-rR メダカ 6 匹（オス 3 匹、メス 3 匹）の行動を 55 日間測定した。1, 2 日目は 9:00 に点灯して 23:00 に消灯する明暗サイクル（14:10 LD）下、

3~34 日目は恒常暗下、35~41 日目は再び 9:00 に点灯して 23:00 に消灯する明暗サイクル（14:10 LD）下、42~50 日目は恒常明下、51~55 日目は 15:00 に点灯して翌日 3:00 に消灯する明暗（12:12 LD）下で測定した。給餌は 1~9 日目は明期の中間の 16:00 に行い、10~15 日目は給餌を行わず（絶食）、16 日目の 0:00 時から 30 時間周期の給餌を 7 回連続で行い、24~55 日目は毎日 10:00 時（暗期）に給餌した。測定は 2017 年 4 月 12 日から 2017 年 6 月 5 日に行った。

#### 2.4.3 HNI メダカ

生後約 6 ヶ月の HNI メダカ 6 匹（オス 3 匹、メス 3 匹）の行動を 19 日間測定した。1, 2, 3 日目は 9:00 に点灯して 23:00 に消灯する明暗サイクル（14:10 LD）下、4~19 日目は恒常暗下で測定した。給餌は 1 日 3 回 8 時間おき（00:00 時、08:00 時、16:00 時）に毎日行った。測定は 2016 年 11 月 29 日から 2016 年 12 月 17 日に行った。

#### 2.4.4 加賀メダカ

1979 年 8 月石川県加賀市動橋町の水田・用水から採取し継代維持している野生集団 5 匹（オス 3 匹、メス 2 匹）の行動を 13 日間測定した。1, 2, 3 日目は 9:00 に点灯して 23:00 に消灯する明暗サイクル（14:10 LD）下、4~13 日目は恒常暗下で飼育した。給餌は 1 日 3 回 8 時間おき（00:00 時、08:00 時、16:00 時）に毎日行った。測定は 2016 年 10 月 18 日から 2016 年 10 月 30 日に行った。

#### 2.4.5 小坂井メダカ

1979年11月愛知県宝飯郡小坂井町小坂井の人家脇の水田から採取し継代維持している野生集団6匹（オス3匹、メス3匹）の行動を14日間飼育した。1~4日目は9:00に点灯して23:00に消灯する明暗サイクル（14:10 LD）下、5~11日目は恒常暗下、12~14日目は再び9:00に点灯して23:00に消灯する明暗（14:10 LD）下で測定した。給餌は1日3回8時間おき（00:00時、08:00時、16:00時）に毎日行った。測定は2016年11月7日から2016年11月20日に行った。

#### 2.4.6 大館メダカ

1984年10月秋田県大館市中台（採取地の環境は不明）で採取し継代維持している野生集団6匹（オス3匹、メス3匹）の行動を11日間測定した。1~4日目は9:00に点灯して23:00に消灯する明暗サイクル（14:10 LD）下、5~11日目は恒常暗下で測定した。恒常暗条件における測定5日目の9:00~9:30時の30分間および測定7日目の18:40~19:05時の25分間は照明が点灯していた。給餌は1日3回8時間おき（05:00時、13:00時、21:00時）に毎日行った。測定は2016年6月10日から2016年6月20日に行った。

#### 2.4.7 SK2メダカ（1回目）

生後約4ヶ月のSK2メダカ6匹（オス3匹、メス3匹）の行動を19日間測定した。1, 2, 3日目は9:00に点灯して23:00に消灯する明暗（14:10 LD）下、4~19日目は恒常暗下で測定した。給餌は1日3回8時間おき（00:00時、08:00時、16:00

時)に毎日行った。10日目の9:40に濾過槽上部に設置されている貯水槽の水(約30L)を濾過槽へ注いだ。測定は2017年1月10日から2017年2月2日に行った。

#### 2.4.8 SK2 メダカ (2回目)

計測が終了した上記の生後4ヶ月のSK2メダカ6匹(オス3匹、メス3匹)を恒温室の循環式集合水槽(名東水園製)に戻し16ヶ月齢まで育てた後に再びMDMで22日間行動を測定した。1日目は23:00時に消灯し、2~22日目は恒常暗下で測定した。給餌は1日3回8時間おき(00:00時、08:00時、16:00時)に毎日行った。測定は2017年3月6日から2017年3月27日に行った。

#### 2.4.9 ゼブラフィッシュ

ペットショップで購入したゼブラフィッシュ4匹(オス2匹、メス2匹)の行動を28日間測定した。1~14日目は9:00に点灯して23:00に消灯する明暗サイクル(14:10 LD)下、15~23日目は恒常暗下、24~28日目は再び9:00に点灯して23:00に消灯する明暗(14:10 LD)下で測定した。給餌は1日1回16:00時に毎日行った。測定は2017年6月7日から2017年7月4日に行った。

### 2.5 実験中の観察

行動測定中は遊泳映像を随時監視し死亡個体や不健康な個体(衰弱した個体や異常行動を示す個体)の有無を把握に努めた。全ての測定において衰弱した個体や異常行動を示す個体は認められなかった。2回目のSK2測定の最終日に1匹が水



槽の外で死亡していたことを確認したが、それ以外の測定において死亡例は認められなかった。また、照明点灯時にメダカが遊泳する様子を水槽上部から目視により観察し、抱卵個体の有無の把握にも努めた。メダカでは測定開始日から 3~4 日目までは毎日抱卵個体を認めたが、それ以降抱卵個体は認められなかった。HPRT の測定において測定 5 日目から 44 日目まで抱卵個体は認められなかったが、測定 26 日目から粉餌に加えてブラインシュリンプを毎日与えたところ、測定 45 日目に抱卵個体を再び確認した。実験を終えたメダカを恒温室の集合水槽へ戻しても数日間抱卵個体は認められなかったが、1 週間程経過すると全ての実験群で抱卵個体が認められた。また、実験群の余命が非実験群よりも顕著に短くなることはなかった。

## 2.6 活動の数値化

飼育水槽をステンレス製の遮光ボックス(四国総合研究所、幅 460mm、奥行 560mm、高 515mm)の中に設置されている赤外線照射機内蔵 CCD ビデオカメラ(セイクリサーチ製 型番 ACC-305RHW1/3 インチカラー41 万画素 3.1mm DC12VNTSC)(図 1)で撮影し、水質監視システムである MDM を用いて遊泳軌跡を数値化した。PC に取り込んだ映像をリアルタイムで解析し、1 秒間に 10 フレーム程度の時間分解能で撮影された各フレーム中の各々の個体の像を背景との明るさの違いから抽出し、それを楕円に近似して重心を算出し、その時間における位置座標を X 軸、Y 軸それぞれ 0~320 ピクセル、0~240 ピクセルの範囲で随時記録した(図 1)。そして、各フレームの取得絶対時間と該当フレームのイメージにおける各個体の重心座標を連続するフレーム間で比較計算してピクセル単位の速度・加速度を算出した。MDM は同時に最大 30 匹までの個体のトレースが可能なシステムであるが、個体

同士が交差したり照明の不均一さと映像の不鮮明さに起因してトレースが瞬間的に中断されることが頻発した。また、トレースに失敗すると、新たな別の個体に同じ番号が割り当てられることも頻発した。速度・加速度は7点のトレースデータを2次回帰によって求めた。1日あたりMDMが生産した約500万桁のレコードのうち約8割にあたる約400万桁において速度・加速度が算出できた。すなわち、遊泳軌跡を約0.2秒間隔で数値化することができた。

## 2.7 移動平均の算出

約0.2秒間隔で記録された瞬間の速度データの1時間当たりの移動平均を以下の通り算出した。まず、MDMを搭載したパーソナルコンピュータに接続した外付けHDに保存されている生データを解析用の別のPCへ移動させた。次に、頻発したトレースの中断が原因で膨大なフォルダに分かれている断片的なデータを自作(片田吉彦氏作成, 25)のバッチファイルを用いて1つのファイルに統合した(バッチ処理の詳細は図6参照)。そして、フレーム取得時間を時間台(hour)と分台(min)と秒台(sec)に分け新たな行に書き出し、フレーム番号と位置や速度・加速度のデータと新たに書き出した時間情報を対応させた後に、それらの情報をフリーウェアXAMPP(Apache Friends, <http://www.apachefriends.org/jp/index.html>)を用いて解析用PCに構築したデータベースに収納し、時間台(hour)でソートし直してからフレーム番号と速度と時間(hour)をデータベースから抽出して、時間(hour)台毎の移動平均を高速演算処理ソフト割図を用いて算出した。最後にピクセル単位で表された遊泳速度を水槽の実寸からメートル単位に変換し(1ピクセル=25.3mm)した。各処理(バッチ処理、データベースへの情報の収納、活図での高速演算)に用いたプログラム文は付録2に記載した。

### 3. 結果

移動平均（1時間毎の遊泳速度）の時間変化を測定毎に図7~15に示した。1時間毎の遊泳速度の平均値の生の数値データは付録表12~21に付した。

#### 3.1 明暗サイクルにおける活動性

図7~15に示した遊泳速度（ミリメートル毎秒）の時間変化から、全てのメダカ系統の明暗サイクル下での遊泳速度は、明期に高く、暗期に低い傾向が明瞭に認められた。この明期に活発に活動し、暗期に不活発になる概日性の活動リズムは、給餌を明暗サイクルの暗期に行っても明瞭に認められた（図7、図8）。

#### 3.2 明暗サイクル下での明期開始前の活動性

9:00時に点灯し、23:00時に消灯する明暗サイクル（14:10 LD）における全測定日の遊泳速度の時間台毎の平均を求め、その値の時間変化（平均波 Mean Wave）を図16に示した。ゼブラフィッシュと大館メダカでは、照明点灯時刻の2~4時間前から活動が徐々に高まり、ゼブラフィッシュの活動は点灯1~2時間前には明期と同程度の大きさを示した（図16A, 16B）。一方で、大館を除くメダカでは、そのような傾向は認められず、暗期の活動は給餌時間台を除き一貫して低調に推移し、明期前の活動性の上昇は認められなかった（図16C, 16D, 16E, 16F, 16G, 16H, 16I）。ゼブラフィッシュと大館メダカは、光刺激を受ける数時間前から活動を開始していること、大館以外のメダカは光を受けるまで活動を開始せず、光を受けた後に活動を開始していることが示された。

### 3.3 恒暗条件における活動性

明暗サイクルにおいてははっきりと認められた概日性の活動リズムは、恒暗条件下では一切認められなかった（図 8~15）。恒暗条件における HNI、加賀、大館の活動に 8 時間毎の給餌時間台に活動のピークをもつリズム変動が認められた（図 9, 10, 11）。大館ではさらに恒暗条件の最中に行った短時間の光照射時（測定 5 日目の 9 時台、測定 7 日目の 18 時台）にも活動のピークが認められた（図 12）。恒暗条件における SK2（1 回目）、SK2（2 回目）の活動には、微弱な一峰型の概日性リズム変動が、測定開始から 2 週間程度認められ、2 週間を経過すると一峰型の概日性リズムよりも 8 時間毎の給餌時間台に活動のピークをもつリズム変動が多く認められた（図 13,14）。恒暗条件下で 24 時間サイクル給餌を行った Hd-rR（測定 3~9 日目、測定 24~34 日目）、ゼブラフィッシュ（測定 15~23 日目）のそれぞれの活動には、給餌時間台に活動のピークをもつ概日性リズムが認められたことに加えて、ゼブラフィッシュの活動には深夜から明け方の時間帯に活動のピークが出現する傾向が数日間継続的に認められた（図 8、図 15）。メダカでは、ゼブラフィッシュのような深夜から明け方の時間帯における急峻な活動ピークは認められなかった。

### 3.4 給餌周期と給餌予知

給餌周期（8 時間、24 時間、30 時間）毎に平均波を作成した（図 17, 18）。活動性が給餌時間台に向けて徐々に高まる傾向は、24 時間周期の給餌条件下で認められたのに対して（図 17A, 17B, 17C, 17D）、30 時間周期の給餌条件下では認められなかった（図 17E）。この傾向は、恒暗条件より恒明条件下でより明瞭に認められた

(図 17B, 17C)。8 時間周期の給餌条件下では、8 時間周期の給餌を行ったメダカ 5 系統（大館、加賀、小坂井、HNI、SK2）のうち、大館、小坂井、HNI では一切認められず（図 18A, 18C, 18D）、加賀では 0 時台のみ若干認められ（図 18B）、SK2（1, 2 回目）では 8 時間毎に毎回明瞭に認められた（図 18E, 18F）。

### 3.5 絶食期間における活動性

24 時間周期の給餌条件下で発現していた給餌時間台にピークをもつ一峰型の概日性リズム（図 8 ; Hd-rR 測定 3~9 日目）は、その後の給餌を行っていない絶食期間（測定 10~15 日）において、絶食 2 日目まで明瞭に認められたが、絶食 3 日以降は一切認められなかった。

## 4. 考 察

### 4.1 水温と水質の安定性および魚の健康状態

全ての実験において、水温の大きな変動および長期におよぶ著しい水質の悪化は認められなかったが、数°C程度の水温の変動や一時的な水質の悪化が認められたため、それらのメダカ遊泳速度に対する影響を検証した。水温については、今回の実験において最も大きな変動が認められたゼブラフィッシュにおいて、測定序盤に摂氏 25~26 度であった水温が測定終盤は摂氏 28~29 度まで上昇したことから（付録図 7 参照）、測定序盤と終盤の遊泳速度を比較したところ、明期の遊泳速度に顕著な差は認められなかった（図 15; 序盤も終盤も 65 ミリメートル毎秒程度）。同様に水質についても、今回の実験において水質の一時的な悪化が認められた HPRT において、測定 17, 22 日目に高濃度のアンモニウムイオン 0.5ppm を検出したことから（付録表 3 参照）、高濃度検出時と非検出時の遊泳速度を比較したところ、両者に著しい差は認められなかった。また、実験中は異常行動を示した例は認められず、死亡例も 1 例しか認められなかった。さらに、明暗条件下ではほぼ毎日抱卵個体を認めたことから、MDM 環境下でも産卵していたと考えられる。これらのことから、メダカとゼブラフィッシュが快適に生活できるような良好な環境が維持され、終始健康な状態を保ったまま行動の測定ができたものと判断でき、より確度の高い活動性の評価が本実験により得られたデータから可能であると考えられる。

## 4.2 活動に概日性リズムがみられる条件

明暗サイクル下で行った全ての実験において、明期に活発に活動し、暗期に不活発になる明瞭な概日性の活動リズムが認められた。このことから、メダカとゼブラフィッシュは昼行性の活動リズムをもつ動物であることが確認された。明暗サイクルにおいてみられる活発・不活発状態が明確に区別できる概日性の活動リズムは恒暗条件へ移行すると、SK2を除いて直ちに消失することが示された。このことから、一般的なメダカとゼブラフィッシュは、24時間明暗サイクル下でみられる活発・不活発状態が明確に区別できる概日性の活動リズムは恒暗条件下では一切フリーランしないことを強く示唆するものである。

一方で、24時間周期の給餌条件下ではFAAと考えられる概日性の周期をもつ活動リズムが発現し、この24時間周期の給餌条件下で発現するFAAと考えられる活動リズムは絶食下でも継続するのに対し、30時間周期での給餌条件下では発現しないことが示された。これらの結果から、メダカとゼブラフィッシュにおいてもFAAは24時間周期の給餌サイクル下でのみ発現することを強く示唆するものであり、これはメダカとゼブラフィッシュの体内にも概日時計が備わっていることの証左であると考えられる。

## 4.3 夜行性動物と昼行性動物の活動制御・発現機構の差異

哺乳類の場合、恒暗条件下でも活動における概日性の活動リズムは長期間継続(フリーラン)する。これは、哺乳類の活動が体内の概日時計と強くリンクしており、概日時計の概日リズムが活動に反映しているためであると考えられる。すなわち、

哺乳類の活動は常に概日時計の制御下にあると考えられる。ヒトを含めた哺乳類は本来は夜行性である。夜行性動物の場合、自然界では夜間に活発な活動を野外で行った後、夜が明けて明るくなる前には必ず自分の巣穴に戻っていることが必須である。なぜならば、空がしらみだす頃、その明かりの刺激を手がかりに巣穴に戻ってはいは、他の捕食者に見つかってしまう危険があるからである。そのため、夜行性動物は巣穴に戻るタイミングを外界の情報から知ることはできないため、体内の概日時計を参照してそのタイミングを知る必要性が高い。このことが、哺乳類の活動が概日時計に支配されている理由であると考えられる（図 19 左）。

メダカを明暗のサイクルがある環境から恒暗環境に移行すると、移行直後から活動が一貫して不活発となった。これは、メダカの活動が概日時計の制御下でないからであると考えられる。メダカは昼行性の動物である。昼行性動物の場合、外界の明暗情報を受けてから、夜の休息期に向けた準備をしてもよい。太陽が完全に落ちきるまでの間に、太陽の傾きを見ながら休む準備を行うことができる。すなわち、昼行性動物は、夜行性動物とは異なり、概日時計を参照して行動する必要性が低いため、メダカやゼブラフィッシュの活動は通常の場合、神経系を介した外界からの刺激に対する直接の反応経路が機能しており、活動は概日時計とリンクしていないと考えられる（図 19 右）。ところが、外部の刺激に 24 時間の周期性がみられるようになると、給餌予知のように、概日時計を参照してその周期性を予知する活動をするようになるものと考えられる。すなわち、メダカは体内に備わっている概日時計を参照して行動するかどうかを、外部刺激の 24 時間の周期性の有無により判断して決めている可能性がある。

恒暗条件下では SK2 メダカのみ微弱な概日性の活動リズムが見られたのは、次



のような理由によると考えられる。SK2 は色素輸送不全のため網膜に色素をもたない。そのため、視覚系に異常があると考えられる（おそらく昼盲のような状態）ことから、SK2 には視覚系を介した外界の明暗情報の伝達不全が生じていると思われる。視神経を介した活動制御が機能していない可能性があり、その結果、相対的に概日時計による活動の制御が SK2 メダカでは機能している可能性がある。また一方で、SK2 は外界が暗黒でも活動が強く抑制されず、活動が全体的に散漫になっている結果、給餌により高まった活動がなかなか低下しないため、見かけ上、概日性の活動リズムが微弱に認められるだけであり、他のメダカ同様に概日時計は活動とリンクしていない可能性もある。

## < 謝 辞 >

本論文は、東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻修士課程在学中に所属研究室の動物生殖システム分野において行った研究成果を学位論文としてまとめたものである。動物システム分野三谷啓志教授からは、科学論文の書き方に関する助言を頂いた。執筆当初はあれもこれも記載し、得られた知見の何が重要でどこに新規性があるかが非常に分かりにくかった。不十分ではありますが、このような形に論文としてまとめることができたのは三谷先生のお陰です。心より御礼申し上げます。動物生殖システム分野尾田正二准教授には、研究の進め方や結果の解釈に関する助言を頂いた。常にメダカの立場からメダカの気持ちになって考えておられる尾田先生のお姿から、生物をよく観察することの大切さ、生物現象を研究することの面白さを学んだ。心より御礼申し上げます。東京大学大学院特任研究員の浅香智美博士からは、本研究で用いた HPRT メダカを快く提供して頂いた。また、メダカにも系統ごとに個性があることを教えて頂いたことは考察を書くうえでとても参考になった。心より御礼申し上げます。博士後期課程に在籍される吉村道さんからは本研究で用いた小坂井メダカ、加賀メダカの卵を快く提供して頂いた。心より御礼申し上げます。また日頃から温かく接して下さった研究室の皆様のお陰で充実した研究生活を送ることができた。心から感謝申し上げます。副専攻で所属していた教育学研究科学学校教育高度化専攻の教育内容開発コース教授藤村宣之氏、教育政策開発コース教授勝野正章氏をはじめさまざまな先生方には授業やゼミで大変お世話になった。今後の教員生活に向けてとても有意義な学び直しの機会を提供して頂きました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。最後に、院生生活をあたたく見守り続けてくれた両親に心から感謝申し上げます。

< 引用文献 >

1. Aschoff, J.: Exogenous and endogenous components in circadian rhythms. Cold Springs Harbor Symp. Quant. Biol. 25:11–28; 1960.
2. Pittendrigh, C. S.: Circadian rhythms and the circadian organization of living systems. Cold Springs Harbor Symp. Quant. Biol. 25:159–182; 1960.
3. 海老原史樹文：時間生物学 化学同人 京都 2012
4. Konopka, R. J.; Benzer, S.: Clock mutants of *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 68:2112–2116; 1971.
5. Ralph, M. R.; Menaker, M.: A mutation of the circadian system in golden hamsters. Science 241:1225–1227; 1988.
6. Vitaterna, M. H.; King, D. P.; Chang, A.-M.; Kornhauser, J. M.; Lowrey, P. L.; McDonald, J. D.; Dove, W. F.; Pinto, L. H.; Turek, F. W.; Takahashi, J. S.: Mutagenesis and mapping of a mouse gene, Clock, essential for circadian behavior. Science 264:719–725; 1994.
7. Ines H. Cuesta, Kajori Lahiri, Jose Fernando Lopez-Olmeda, Felix Loosli, Nicholas S. Foulkes & Daniela Vallone Differential maturation of rhythmic clock gene expression during early development in medaka (*Oryzias latipes*), Chronobiology International, 31:4, 468-478; 2014.
8. HURD, M. W., J. DEBRUYNE, M. STRAUME AND G. M. CAHILL. Circadian rhythms of locomotor activity in zebrafish. PHYSIOL BEHAV 65 (3) 465–472, 1998.
9. Gregory M. Cahill Clock mechanisms in zebrafish Cell Tissue Res 309:27–34; 2002.
10. Martin Kavaliers Circadian Locomotor Activity Rhythms of the Burbot, *Lota lota*: Seasonal Differences in Period Length and the Effect of Pinealectomy J. Comp. Physiol. 136, 215-218; 1980.

11. MARTIN KAVALIERS Pineal Involvement in the Control of Circadian Rhythmicity in the Lake Chub, *Couesius plumbeus* J. EXP. ZOOL. 209: 33-40, 1979.
12. Kavaliers, M. Social groupings and circadian activity of the killifish, *Fundulus heteroclitus*. Biol. Bull. 158, 69-76., 1980.
13. Tabata, M., Minh-Nyo, M., Niwa, H. and Oguri, M. Circadian rhythm of locomotor activity in a teleost, *Silurus asotus*. Zool. Sci. 6, 367-375., 1989.
14. Naruse, M.; Oishi, T. Effects of light and food as zeitgebers on locomotor activity rhythms in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Zool. Sci. 11:113-119; 1994.
15. MASAYUKI IIGO AND MITSUO TABATA Circadian Rhythms of Locomotor Activity in the Goldfish *Carassius auratus* Physiology & Behavior, Vol. 60, No. 3, pp. 775-781, 1996.
16. F. J. SNCHEZ-VZQUEZ, J. A. MADRID, S. ZAMORA, M. IIGO AND M. TABATA Demand Feeding and Locomotor Circadian Rhythms in the Goldfish, *Carassius auratus*: Dual and Independent Phasing Physiology & Behavior, Vol. 60, No. 2, pp. 665-674, 1996.
17. Masayuki Iigo, Mitsuo Tabata Circadian Rhythms of Locomotor Activity in Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss* Fisheries Science 63(1), 77-80, 1997.
18. ZIAD BOULOS, ALAN M. ROSENWASSER and MICHAEL TERMAN FEEDING SCHEDULES AND THE CIRCADIAN ORGANIZATION OF BEHAVIOR IN THE RAT Behavioural Brain Research, 1, 39-65, 1980.
19. RALPH E. MISTLBERGER Circadian Food-Anticipatory Activity: Formal Models and Physiological Mechanisms Neuroscience and Biobehavioral Reviews, Vol. 18, No. 2, pp. 171-195, 1994.
20. J. A. Sanchez & F. J. Sanchez-Vazquez FEEDING ENTRAINMENT OF DAILY RHYTHMS OF LOCOMOTOR ACTIVITY AND CLOCK GENE EXPRESSION IN ZEBRAFISH BRAIN, Chronobiology International, 26:6, 1120-1135, 2009.

21. L. L. M. Vera, P. Negrini, C. Zagatti, E. Frigato, F. J. Sánchez-Vázquez & C. Bertolucci  
Light and feeding entrainment of the molecular circadian clock in a marine teleost (*Sparus aurata*), *Chronobiology International*, 30:5, 649-661, 2013.
22. NAOTO YAMADA, KAZUTAKA SHIMODA, KIYOHISA TAKAHASHI AND SABURO TAKAHASHI Relationship Between Free-Running Period and Motor Activity in Blinded Rats *Brain Research Bulletin*, Vol. 25. pp. 115-119.,1990.
23. Jose F. López-Olmeda, Erica V. Tartaglione, Horacio O. de la Iglesia & Francisco J. Sánchez-Vázquez FEEDING ENTRAINMENT OF FOOD-ANTICIPATORY ACTIVITY AND *per1* EXPRESSION IN THE BRAIN AND LIVER OF ZEBRAFISH UNDER DIFFERENT LIGHTING AND FEEDING CONDITIONS, *Chronobiology International*, 27:7, 1380-1400, 2010.
24. 尾田 正二, 西槇 俊之, 勝村 啓史, 片田 吉彦, 小賀 厚徳, 池本 健三, 谷口 善仁, 太田 博樹 連続全身組織切片と 24 時間トラッキングによるメダカの組織形態と 活動性の網羅的な解析 *Cytometry Research* 24 (2) : 9 ~ 14, 2014.
25. 芳村勇毅 長期間リアルタイムトレーシングによるメダカの概日リズムに関する研究 修士論文 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻 2016.
26. Gregory M. Cahill circadian regulation of melatonin production in cultured zebrafish pineal and retina *Brain Research* 708, 177-181, 1996.
27. 三東桜子 突然変異を *in vivo* で可視化する HPRT-dup-GFP メダカ系統の作製 修士論文 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻 2016.