

助成番号 0921

モデル魚類の塩味嗜好アッセイ系の構築と塩分恒常性調節機構の解析

安岡 顕人

前橋工科大学生物工学科

概要 人と淡水魚はともに脊椎動物であるが、生息している浸透圧環境は異なる。人は発汗や排泄で失った NaCl を食物から補う。一方、淡水魚は低浸透圧下で常に NaCl を失う傾向にあるため、消化管や鰓で塩を積極的に吸収している。しかし、供給源となる食物中の NaCl への嗜好性の制御に関しては未解明な部分が多い。申請者は脊椎動物の NaCl 嗜好性の制御機構を解析するため、メダカの塩味嗜好を行動学的にアッセイする系の開発を試みた。味物質としては、NaCl に近い挙動を示し、pH による検出が容易なクエン酸を用い、水溶性味物質の保持に重点をおいた2種類の人工食の開発を行った。まず、油中水滴型(W/O 型)エマルジョン構造の食を作製した。パーム油と界面活性剤にクエン酸と寒天を加え、W/O 型の乳液とし、アルミホイルに噴霧して回収した。同様にクエン酸を含まない W/O 食も作製した。これらを1ヶ月齢のメダカに与えたが、酸の有無に関係なく、最初についばんだ後は関心を示さなくなった。次に油脂を水中に分散させた O/W 型エマルジョン構造の食餌を作製した。これを味物質の有無と対応した2種類の蛍光色素 DiI と DiO で標識し、両者の摂食比を検出した。まず、メダカが忌避する事が分かっているデナトニウム(DN)を用いた。1) DiI 標識した DN 食と DiO 標識した NT 食、2) DiI 標識した NT 食と DiO 標識した DN 食、3) DiI 標識した NT 食と DiO 標識した NT 食を与えた3群について、DN 食を食べた割合の平均値を比較したところ、2-3 群間には有意差が見られなかったものの、1-3 群間には有意差が認められ、デナトニウムへの忌避を検出することができた。同様のアッセイをクエン酸について行ったが、クエン酸食の摂食比率の群間の差は検出できなかった。原因として、酸の流出が予想より速かったことが挙げられる。今後はより高分子量の酸や塩、例えばアルギン酸、ガラクトロン酸やこれらの塩を用いることを予定している。

1. 研究目的

人と淡水魚はともに脊椎動物であるが、生息環境の浸透圧条件は異なる。人では発汗や排泄で NaCl が失われ、消化管を介した食物からの吸収と腎臓を介した排出がなされる。淡水魚は低浸透圧環境にあるため、鰓や消化管の塩類細胞で積極的に塩を吸収し、腎臓から低張の尿を排出することにより塩分恒常性を保っている。一方、供給源となる食物中の NaCl の嗜好性の制御機構に関しては未解明な部分が多い。申請者は脊椎動物の NaCl 嗜好性の制御機構を解析するため、低浸透圧環境で塩分を常に必要としている小型魚類をモデルとし得るのではないかと発想した。すでに我々はデンプンを担体としてアミノ酸や苦味物質を含む人工食を開発し、これらの味物質に対するメダカの嗜好、忌避行動を検出することに成功している

⁽¹⁾。本研究では、より水への溶解性が高い塩や酸を味物質として保持した人工食の開発を行い、メダカの塩味嗜好性を定量化することを目的とした。

2. 研究方法

2.1 メダカの維持

メダカは近交系 Cab (Japan National Bioresource Center) を用いた。水槽は脱塩素処理した水に人工海塩を加えて pH 8.0、コンダクタンス 750 μ S に調整し、28°C、明暗周期 12 時間/12 時間で飼育した。

2.2 メダカの摂食量の評価

受精後 19 日のメダカを 25~26°C の静水中で 24 時間絶食させた。0.1×BSS (17.0 mmol/l NaHCO₃, pH 7.5) を 40 ml を入れた 90 mm シャーレにメダカを 10 尾ずつ移した。

寒天食は約2 mg、二食混合アッセイでは2種類の食餌 3 mg ずつを濾紙上で混ぜ合わせ、撒布し、150秒間自由摂食させた。試験終了後、氷水中で麻酔し、96穴マイクロプレートウェルに1個体ずつ凍結した。解凍したメダカ個体のDiIあるいはDiOの蛍光画像を倒立蛍光顕微鏡を用いて取得した。Photoshop 6.0を用いて画像をグレースケールに変換し、Scion Image Beta 4.0.3を用いて消化管領域のピクセルの輝度を積算した。

2.3 油中水滴型エマルション(W/O)食の作製

加温した蒸留水にアガー 1%、クエン酸 200 mM、dextran-rhodamine B 0.01% を溶解し、分散相とした。加温した高融点精製パーム油にショ糖エルカ酸エステルを4% 添加し、連続相とした。分散相と連続相等量を合わせ70°Cでホモジナイザーにて乳化した。乳液を加温した霧吹を用いて氷冷したアルミホイルの上に噴霧し、常温で固化したものをW/O食とした。

2.4 寒天食の作製

70°Cに加温した高融点精製パーム油5 mlにDiIC12(3)の10 mmol/L エタノール溶液 125 µl あるいはDiOC16(3)の5 mmol/L エタノール溶液 125 µl を添加し、分散相とした。蒸留水 18 ml にアガロース 1.0 g を加えて溶解し、Tween 20 0.5 g を添加して連続相とした。連続相と分散相を合わせ、ホモジナイザーで2分間乳化した。加温した味物質溶液(CA食:2 Mクエン酸溶液, DN食:10 mM デナトニウム溶液, NT食:蒸留水)を2 ml 添加し、再度20秒乳化した。以上の操作は70°Cで行った。加温した霧吹で乳液をクッキングシート上に噴霧し、室温で二晩風乾した。乾燥した寒天食を粉砕し、直径150 - 212 µm の粒子を得た。

3. 結果と考察

本研究ではNaClを味物質とした人工食の作製を目指したが、予備段階として、NaClに近い挙動を示し、pHによる検出が容易なクエン酸を用いて人工食の物性の条件検討を行った。まず、すでに開発したデンプン担体食⁽¹⁾を用いて、クエン酸を含浸させた食を作製し、摂食アッセイを行ったが、水への溶解が速く、アッセイが困難であった。そこで、水溶性味物質の保持に重点をおいた以下のような食の開発を行った。

3.1 油中水滴型エマルション食の作製

水溶性である塩が直接水に触れないようにするため、油でその表面を覆った食餌の作製を試みた。食品のバターと同様の油中に微小な水滴が分散した油中水滴型(W/O型)エマルション構造である(Fig. 1)。味物質として塩の代わりにクエン酸を用いた。

精製高融点パーム油と界面活性剤であるショ糖エルカ酸エステルにクエン酸 200 mM とアガー 1% を含む水溶液を加え、W/O型の乳液を作製した。乳液をアルミホイルに噴霧し、回収した。同様の方法により、クエン酸を含まないW/O食も作製した。これを官能検査したところ、固化後の食餌は舐めても酸味を呈しなかったが、固化する前のエマルション状態では酸味を呈した。W/O食を酸塩基指示薬であるブロモフェノールブルー(BPB)溶液に撒布したところ水は変色しなかった。次に、クエン酸を含むW/O食と含まないW/O食それぞれを1ヶ月齢のメダカに撒布し、摂食行動を観察した。その結果、メダカは水面に浮かぶ食餌を何度かついでにむもの全てを吐き出し、その後関心を示さなくなった。この行動は酸の有無に関係なく同じだった。以上の結果より、W/O食は酸を内部に保持することは成功したものの、メダカの摂食しないような性状だったこと、仮に摂食したとしてもメダカの口腔内で酸の浸出が起きず、酸味刺激を与えられないことから行動評価系には

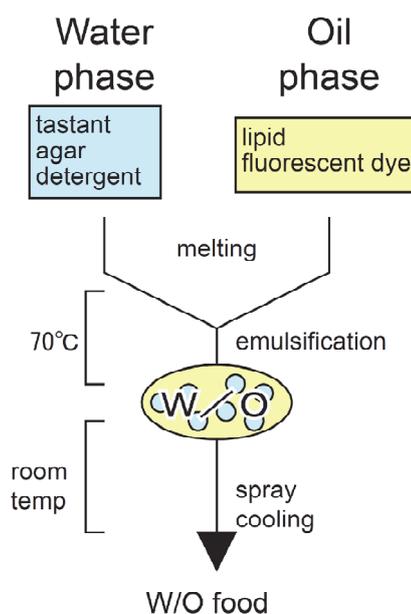


Figure 1. Production of W/O emulsion food

用いることが出来ないと判断した。なお、この食餌は内部の水溶性物質を完全に保持可能という点で、水溶性の機能性成分や薬剤を口腔内で漏出させることなく摂取することが可能であり、食品や薬品等への応用が期待できる。

3.2 寒天食の作製

次にアガロースを担体とした食餌を作ることで酸の浸出を抑える手法を検討した。食餌の比重を下げるために、油脂を水中に分散させた O/W 型エマルジョン構造とした。水相に味物質と寒天を溶解し、エマルジョンを凝固・乾燥させることで、微小な脂質粒子を味物質入りの寒天がつながる構造の食餌を作製した (Fig. 2)。乾燥した膜状の食餌を粉碎し、粒径 150-212 μm の寒天食を得た。これを官能検査したところ、酸味が感じられた。この寒天食をブロモフェノールブルー (BPB) 溶液に撒布したところ、水面に浮き、水面付近の BPB 溶液を黄色にした。溶液を攪拌すると水底に沈み、溶液全体を黄色に変色させた。寒天食を20日齢のメダカ稚魚10匹に与え、摂食行動を観察した。どちらの食餌についても稚魚は摂食(嚙下)行動を示したが、漏出した酸に起因すると考えられる逃避行動が見られた。

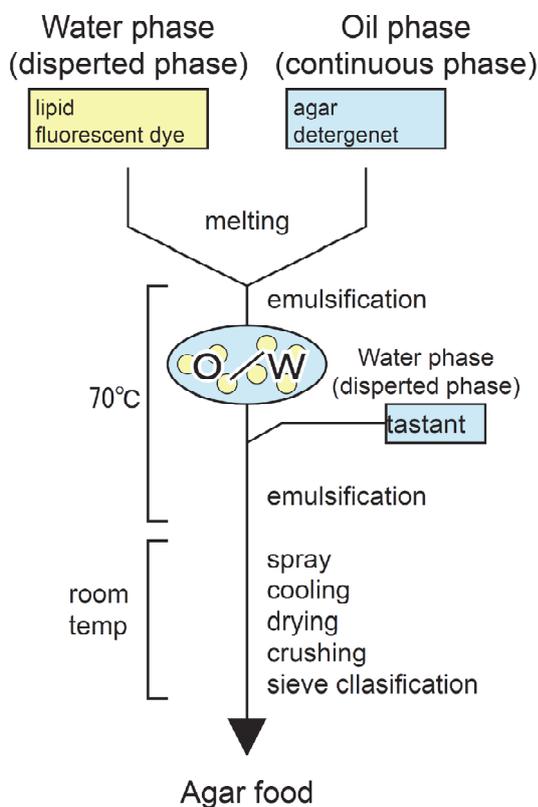


Figure 2. Production of the agar food

3.3 二色混合アッセイ

味物質を含む寒天食と含まない寒天食を異なる蛍光色素で標識をし、両者の摂食量の比や差を検出することを試みた。まず、メダカが忌避する事が分かっているデナトニウム(DN)を用いてアッセイを行った。以下に示す3群20匹ずつを1セットとして、2回行った。

- ①DN(I)-NT(O)群 (DiI 標識した DN 食と、DiO 標識した NT 食の組み合わせ)
- ②NT(I)-DN(O)群 (DiI 標識した NT 食と、DiO 標識した DN 食の組み合わせ)
- ③NT(I)-NT(O)群 (DiI 標識した NT 食と、DiO 標識した NT 食の組み合わせ)

各群について、③群の平均 DiI 蛍光と平均 DiO 蛍光の比を求め、その比が 1:1 になるように値を補正し、補正後のデータで2色の合計値が10に満たない個体を除いた(各群の個体数は順に17、19、18匹)。①群、②群について DiI 標識食と DiO 標識食の蛍光を対応のある t 検定により比較した結果、棄却率 5% で有意差は見られないものの、NT 食と比較して DN 食の摂食量が小さい傾向が示された (Fig. 3A)。さらに各個体について補正後の DiI 蛍光値と DiO 蛍光値の合計における DiI 蛍光の割合を計算し、その平均値を求めた。各群の摂食比率をウェルチの t 検定によって比較したところ、② - ③群間には有意差が見られなかったものの、① - ③群間については棄却率 5% で有意差が認められた (Fig. 3B)。

次に、クエン酸についても同様のアッセイを行った。CA 食と NT 食それぞれについて DiI、DiO で標識した計4種類の食餌を作製し、次の3群20匹ずつについて2回アッセイを行った。

- ①CA(I)-NT(O)群 (DiO 標識した NT 食と、DiI 標識した CA 食の組み合わせ)
- ②NT(I)-CA(O)群 (DiO 標識した CA 食と、DiI 標識した NT 食の組み合わせ)
- ③NT(I)-NT(O)群 (DiO 標識した NT 食と、DiI 標識した NT 食の組み合わせ)

同様のデータ処理を行い、これらの平均値を求めると、②群では NT 食と比較して CA 食の摂食量が小さい傾向が見られたが、①群②群共に対応のある t 検定を行った結果、棄却率 5% で有意差は見られなかった (Fig. 4A)。

次に各群の DiI 標識食の摂食率の平均値についてウェルチの t 検定を行ったが、棄却率 5% で有意差が見られなかった (Fig. 4B)。クエン酸入りの寒天食は水につけることで酸の大半が流れ出てしまうという前述の実験結果を踏

まると、この二色混合アッセイでは食餌を撒布してからアッセイの時間である 2 分 30 秒以内に CA 食からクエン酸の大半がしみ出してしまい、CA 食と NT 食の区別がつかなくなってしまったと考えられる。

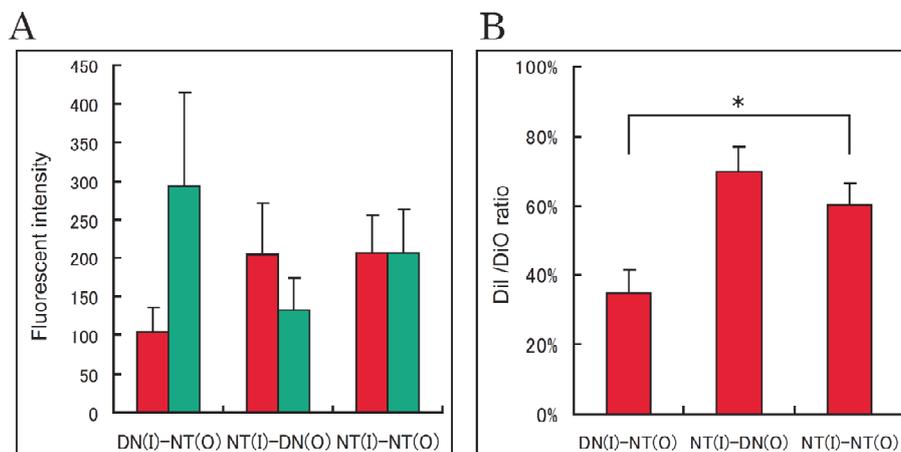


Figure 3. Evaluation of medaka's preference / avoidance toward denatonium using the two color labeled agar food. Relative amount of ingested food were quantified by fluorescent intensity detected in medaka larvae. Larvae groups were fed with DN(I), food containing denatonium and DiI; NT(O), food containing no tastant and DiO; NT(I), food containing no tastant and DiI; CA(O), food containing denatonium and DiO in combination as indicated at the bottom. Significant avoidance toward denatonium was detected in the case of DN(I)-NT(O) combination (*, $p < 0.05$, Welch's t test).

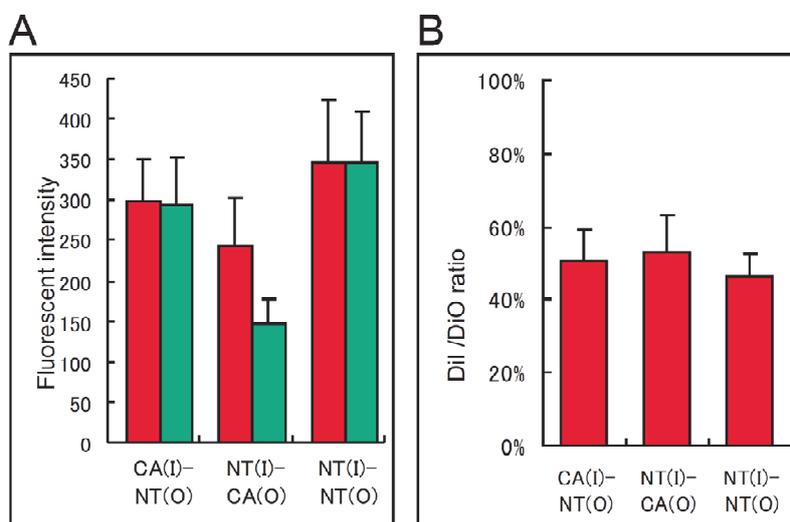


Figure 4. Evaluation of medaka's preference / avoidance toward citric acid using the two color labeled agar food. Relative amount of ingested food were quantified from fluorescent intensity detected in medaka larvae. Larvae groups were fed with CA(I), food containing citric acid and DiI; NT(O), food containing no tastant and DiO; NT(I), food containing no tastant and DiI; CA(O), food containing citric acid and DiO in combination as indicated at the bottom. No significant difference was detected among larvae groups using Welch's t test.

4. 今後の課題

本節の検討では、メダカの酸味に対する嗜好性を判定する評価系を確立することは出来なかった。ただし、水溶液を完全に保持する食餌として W/O 食が、従来のデンプン担体標識食よりも簡便に作製可能な味物質含有餌として寒天餌が開発された。また、メダカ個体毎の餌に対する嗜好・忌避を判定可能な二色混合アッセイを確立した⁽²⁾。今後はより高分子量の酸や塩、例えばアルギン酸やガラクトuron酸とその塩を寒天餌に混入し、酸からのプロトンの解離や塩からの対金属イオンの解離を制御することを予

定している。

文献等

- (1) Aihara Y, Yasuoka A, Iwamoto S, Yoshida Y, Misaka T, Abe K (2008) Construction of a taste-blind medaka fish and quantitative assay of its preference-aversion behavior. *Genes Brain Behav* 7: 924-932.
- (2) 摂食行動評価系を用いたモデル魚類の酸味受容機構の解析、日本農芸化学会、P05 3P0521A

No. 0921

Construction of Assay System for Salt Preference and Analyses of Regulatory Mechanism of Salt Homeostasis in Model Fish Species

Akihito Yasuoka

Department of Biological Engineering, Maebashi Institute of Technology

Summary

Although both human and fresh water fish belong to vertebrate class, their osmotic circumstances are different. Human lose salts through perspiration and obtain them from food. Fresh water fish are under the threat of salt shortage because of low osmotic potential of the circumstance and always trying to obtain salts via gill and digestive tract. However, mechanism involved in the behavioral regulation of salt uptake remains to be elucidated. To analyze the regulation of preference toward salt in vertebrates, we aimed to develop behavioral assay system for salt preference of fresh water fish, medaka. Citric acid was used for standard tastant because of its physical property similar to that of sodium chloride and its easy detection by monitoring pH. Two kinds of foods were produced taking retaining ability of water soluble tastants into consideration. One is the water in oil (W / O) type food where citric acid and molten agar was dispersed into palm oil by detergent. This emulsion was sprayed and the resulting particles were fed to one month old medaka larvae together with those containing no tastant. The larvae showed no interest to the food after pecking it several times. Next we examined oil in water (O / W) type food labeled with two kinds of fluorescent dye (DiI and DiO) each of which corresponds to the presence and the absence of tastant. As the control experiment, Denatonium (DN), which has been proved to be avoided by medaka, was included into the food. Three groups of larvae were fed with 1) DN food labeled with DiI plus no tastant food labeled with DiO, 2) DN food labeled with DiO plus no tastant food labeled with DiI and 3) no tastant food labeled with DiI plus no tastant food labeled with DiO, respectively. Then the ratio of ingested food containing tastant were analyzed in each larvae. As a result, aversion to DN was detected as the smaller ratio of DN food ingestion in group 1 than that of no tastant food in group 3. The same behavioral assay were performed using citric acid resulting in the detection of no significant difference of ingestion ration of citric acid food. This may results from higher efflux rate of citric acid than expected. We will conduct this two color labeled assay using water insoluble acid such as alginic acid and polygalacturonic acid and their salts.