

令和元年6月16日現在

機関番号：13101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19385

研究課題名(和文)月周時計の実体解明への挑戦：月周産卵フグを用いた分子基盤の確立

研究課題名(英文) Exploring the molecular mechanism of lunar clock: transcriptome analysis to establish the molecular basis of lunar-synchronized rhythm in the grass puffer, a semilunar spawner

研究代表者

安東 宏徳 (ANDO, Hironori)

新潟大学・佐渡自然共生科学センター・教授

研究者番号：60221743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：新月と満月の日に産卵を繰り返すクサフグを用いて、半月周性の産卵リズムを刻む“月周時計”の分子基盤を確立するため、クサフグ脳のトランスクリプトーム解析を行い、月齢に伴って発現変動する遺伝子群を網羅的に解析した。産卵期の1カ月間に6回、脳を採集してRNA-Seq解析を行った結果、概潮汐リズムに関連すると考えられるmelやnpasや概日時計遺伝子を含む多くの遺伝子が、新月と満月に発現量の底あるいはピークを持つ半月周期の発現変動を示すことが明らかになった。概日時計と概潮汐時計が相互作用して半月周期の転写調節に関わる可能性と、それらとは独立した分子群が“半月周時計”を作る可能性が考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

生物リズムを調節する分子機構については、24時間周期の概日リズムについて詳細な研究が進められているが、それ以外の周期を持つ生物リズムについてはわかっていない。月齢に同調したリズムについて、サンゴやゴカイなどの研究から、(半)月周リズムは概日リズムの発振機構とは独立していることが示唆されているが、その分子機構は不明である。本研究では、新月と満月の日に産卵を繰り返すクサフグを用いて、脳内で月齢に伴って発現量が変動する遺伝子群を網羅的に探索し、半月周性の産卵リズムを刻む“半月周時計”の分子的基盤を確立した。

研究成果の概要(英文)：To establish the molecular basis of a novel clock mechanism underlying the semilunar-synchronized spawning rhythm of the grass puffer, a transcriptome analysis was conducted in the telencephalon and diencephalon by RNA-Seq to search genes that exhibit lunar age-dependent oscillations in expression. The brains were sampled at midnight every 5 days in a lunar month. More than 7000 genes from approximately 19000 expressed genes showed semilunar oscillations in expression with two peaks or troughs at the night of new moon and full moon. These included circadian genes and ultradian oscillation genes that may be related to a circatidal clock in the grass puffer.

研究分野：生殖内分泌学、神経内分泌学

キーワード：月周リズム 概日時計 生殖リズム 視床下部 トランスクリプトーム クリプトクローム フグゲノム

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

地球上の生物は、ほぼ 24 時間を 1 周期とする概日リズムを持っている。このリズムを作る体内時計 (概日時計) は、脳の視床下部あるいは松果体に存在し、複数の概日時計遺伝子の転写と翻訳の調節によって駆動されている。近年、1 日より長い周期の生物リズム (概月リズムや概年リズムなど) や短い周期の生物リズム (概潮汐リズムなど) の存在が報告され、生物リズムの多様性として注目されているが、その分子機構はほとんど明らかになっていない。我々は、これまで半月周性 (2 週間周期) の産卵リズムを持つクサフグを用いて、月齢に同調した生物時計 (月周時計) の分子機構について研究してきた。本研究開始当初までに、主に次の 4 点が明らかになってきた: 1) クサフグは、水槽内の一定の環境条件下で半月周性の行動リズムを示し、内因性の半月周リズムを持つ、2) 視床下部の生殖調節神経ホルモンの遺伝子発現は、日周変動を示し、概日時計とメラトニンによって調節される、3) 複数の生殖調節神経ホルモンの遺伝子発現は月周変動を示す、4) 概日時計遺伝子の一つであるクリプトクローム (Cry) 1 の発現は月周変動を示す。これらの知見から、クサフグの脳には月周に同調した遺伝子発現リズムを作る周期的転写調節のしくみ、すなわち “月周時計” が存在すると考えられる。そこで本研究では、その月周時計の分子実体を解明する基盤を確立するため、クサフグの脳内で発現量が月周発現する遺伝子を網羅的に探索し、Cry との関連を明らかにすることを計画した。

### 2. 研究の目的

本研究は、新月と満月の日に産卵を繰り返すクサフグを用いて、半月周性の産卵リズムを刻む “月周時計” の分子基盤を確立することを目的とする。そのため、クサフグ脳のトランスクリプトーム解析を行い、月齢に伴って発現変動する遺伝子群を網羅的に解析し、月周時計を構成する分子群および月周時計の調節を受ける分子群の候補を探索した。また、月周リズムの発振に関わると考えられる Cry ファミリー遺伝子の月周変動を解析した。

### 3. 研究の方法

産卵期に野生のクサフグ雄の成魚 (n = 48、平均体重 55.7 g、平均生殖腺指数 4.5%) を捕獲し、佐渡臨海実験所で自然日長下 (14 時間明期、10 時間暗期) で飼育した。月齢 24.0、29.0 (新月) 4.7、9.7、14.7 (満月) 19.7、24.7 の日の暗期 (ZT18) に、微弱赤色光下で脳を採取して終脳と間脳試料を得た。両試料から RNA を調製し、各試料中に含まれるキスペプチン (Kiss2) と生殖腺刺激ホルモン放出抑制ホルモン (GnIH) およびそれらの受容体 (Kiss2r と GnIHR) の各遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法で解析した。また、クサフグの間脳において約 15 時間周期のウルトラディアン発現リズムを示し、概潮汐リズムの形成に関わると考えられるメラトニン受容体 1b 遺伝子 (*mel1b*) と Neuronal PAS domain protein 3 遺伝子 (*npas3*) の発現量の変化も解析した。

月齢 24.0 を除く 6 群 (29.0 ~ 24.7) のそれぞれ 3 個体について、終脳と間脳の RNA 試料を混合したものを材料としてシーケンスライブラリーを作製し、NovaSeq 6000 (illumina) により RNA シーケンスを行った。シーケンス解析によって得られたリード配列をトラフゲノム配列にマッピングし、ゲノム位置情報からアノテーションを行って、遺伝子毎に発現量を算出した。得られた発現量に対して多群間比較を行い、発現変動遺伝子群の階層クラスタリング解析と KEGG Pathway を用いた頻度解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 月周変動解析試料中の *kiss2*, *kiss2r*, *ginh*, *ginhr*, *mel1b*, *npas3* の発現量の変化

終脳/間脳試料において、*kiss2*, *kiss2r*, *ginh*, *ginhr* の各遺伝子の発現量は、よく似た変動パターンを示し、新月と満月にピークを持つ半月周期の変動を示した。また、*mel1b* と *npas3* も半月周期の変動を示し、クサフグの半月周性産卵リズムが概潮汐時計と概日時計の相互作用によって作られる可能性が示された (ビート仮説)。

#### (2) 終脳/間脳のトランスクリプトーム解析

シーケンスに十分なライブラリーが作製できなかった 1 個体を除く 17 個体 (6 群) の RNA

シーケンスを行った。それぞれ、約 100,000,000 個のリード配列が得られ、その約 94% がトラフグゲノム配列にマッピングされた。総発現遺伝子数は、18896 個であった。これらのうち、6 群のいずれかの群で発現変動を示した遺伝子は 7556 個であった。これらの遺伝子群のクラスタリング解析を行った結果、7 つのクラスターに分けられ、これらは大きく次の 3 つの発現パターンを示した：グループ 新月と満月に発現量が減少して半月周期で変動する、グループ 新月と満月に発現量が増加して半月周期で変動する、グループ 月齢に伴った変動を示さない。グループ の遺伝子群 (5121 個) は、発現レベルが低く、Neuroactive ligand-receptor interaction Pathway などに最も多く含まれる遺伝子群であった。また、*mel1b* や *npas3* 概日時計遺伝子である *per* が含まれていた。グループ の遺伝子群 (1993 個) は発現レベルが高く、Oxidative phosphorylation Pathway などに最も多く含まれる遺伝子群であった。グループ の遺伝子群 (442 個) は発現レベルが中程度で、Cell adhesion molecules Pathway などに最も多く含まれる遺伝子群であった。これらの結果より、クサフグ脳内では、全発現遺伝子の約 3 分の 1 の遺伝子が、新月と満月に発現量の底あるいはピークを持つ半月周期の発現変動を示すことが明らかになった。

### (3) Cry ファミリー遺伝子の月周変動

Cry ファミリー遺伝子のうち、*cry1* は新月と満月に発現量が低下する半月周期の変動パターンを示したが、*cry2* と *crydash* は変化しなかった。

以上の結果から、クサフグの脳内において、*cry* や *per* の概日時計遺伝子、概潮汐リズムに関連すると考えられる *mel* や *npas* を含む多くの遺伝子が半月周期の発現変動を示すことが明らかになった。概日時計と概潮汐時計に関わる分子群が相互作用して半月周期の転写調節に関する可能性と、それらとは独立した“半月周時計”を作る分子群がある可能性が考えられる。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計 6 件)

Rahman, M., Zahangir, M.M., Kitahashi, T. Shahjahan, M., Ando, H. (2019). Effects of high and low temperature on expression of GnIH, GnIH receptor, GH and PRL genes in the male grass puffer during breeding season. **Gen. Comp. Endocrinol.** (in press).

Ando, H., Shahjahan, Md. and Kitahashi, T. (2018). Periodic regulation of expression of genes for kisspeptin, gonadotropin-inhibitory hormone and their receptors in the grass puffer: Implications in seasonal, daily and lunar rhythms of reproduction. **Gen. Comp. Endocrinol.** 265: 149-153. DOI: 10.1016/j.ygcen.2018.04.006

安東宏徳, (2018). クサフグの半月周性産卵回遊リズムの調節機構, **比較生理生化学** 35: 45-53. <https://doi.org/10.3330/hikakuseiriseika.35.45>

Shahjahan, Md., Kitahashi, T., Ando, H. (2017). Temperature affects sexual maturation through the control of kisspeptin, kisspeptin receptor, GnRH and GTH subunit gene expression in the grass puffer during the spawning season. **Gen. Comp. Endocrinol.** 243: 138-145. DOI: 10.1016/j.ygcen.2016.11.012

### [学会発表](計 18 件)

Hironori Ando, Ultradian expression genes in the brain of grass puffer, a semilunar spawner. IBRO Advanced School of Neuroscience Malaysia, 2018 年

Hironori Ando, 他 3 名, Melatonin, the hormone of gloom: Implications in the semilunar-synchronized spawning of the grass puffer. 8th Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, 2018 年

Mohammad Lutfar Rahman, Md. Shahjahan, Hironori Ando, Immunolocalization of kisspeptin and kisspeptin receptor in the brain of grass puffer. 8th Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology, 2018 年

Hironori Ando, 他 2 名, Periodic control of kisspeptin and its receptor gene expression

by photic and non-photoc environmental cues in the grass puffer, a semilunar spawner.  
18th International Congress of Comparative Endocrinology、2017 年  
安東宏徳、クサフグの半月周性産卵リズムの調節機構：メラトニンシグナルと概潮汐時計。  
第 12 回水生動物の行動と神経系シンポジウム、2017 年  
安東宏徳、“夜のホルモン”から“夕闇のホルモン”へ：月周産卵との関係。日本動物学会  
第 88 回大会・シンポジウム「メラトニンとその多彩な機能」、2017 年

〔図書〕(計 1 件)

安東宏徳,(2018). ホルモンの作用濃度 ,動物学の百科事典(日本動物学会編),pp 436-437 ,  
丸善出版

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sc.niigata-u.ac.jp/sc/sadomarine/>

6. 研究組織

(1)連携研究者

連携研究者氏名：北橋 隆史

ローマ字氏名：KITAHASHI Takashi

所属研究機関名：新潟大学

部局名：佐渡自然共生科学センター臨海実験所

職名：特任助教

研究者番号(8 桁)：30749859

(2)研究協力者

研究協力者氏名：土井 啓行

ローマ字氏名：DOI Hiroyuki