

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：32689

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2019

課題番号：18K19348

研究課題名(和文) 月齢応答機構の解明に向けたモデル細胞の創出

研究課題名(英文) Establishment of a model cell to study photoresponsive mechanisms to moonlight

研究代表者

岡野 俊行 (Okano, Toshiyuki)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号：40272471

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,800,000円

研究成果の概要(和文)：フグやアイゴといった魚類は、月齢に依存した産卵行動を示す。光生物学および時間生物学分野において、月齢応答の仕組みは未だ不明である。この分子機構を解明するためには、月光に応答する細胞株を確立し、月光応答性と概月性の有無を調べるのが重要である。そこで本研究では、明るさと明期時間帯が複雑に変化する月光を再現する人工月光装置を作製し、その下でフグ培養細胞や魚個体を維持し、概日時計遺伝子等の光応答性を調べ、フグ眼球由来の細胞が月光応答機構のモデルとして使用できることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

この20年の間に概日時計の仕組みが次々と解明された。それに比べて、フグやアイゴの産卵に見られる2週間あるいは1月周期性の分子機構は不明である。これを明らかにするためには、月光に応答する細胞を用いて、長期間に渡り遺伝子発現変動を調べる系の確立が重要であった。本研究では、Fugu Eye細胞が、その第一歩となるモデルとして利用できる可能性を示した。本研究の成果は、将来的にはフグの産卵を制御し、より効率的な養殖や育種につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Fish such as puffer fish and spinefoot show a spawning behavior depending on the moon phase. In photobiology and chronobiology, the mechanism of the moonlight response is still unknown. In order to elucidate this molecular mechanism, it is important to establish a cell line that responds to moonlight and examine the presence or absence of moonlight responsiveness and circalunar rhythm. Therefore, in this study, we constructed an artificial moonlight device that reproduces the moonlight with complex changes in brightness and light period. Using this device, we examined the moonlight responsiveness of circadian clock genes in cultured pufferfish cells and individual fish. It was clarified that the pufferfish eye-derived Fugu Eye cells could be used as a model of the moonlight response mechanism.

研究分野：光生物学

キーワード：生物時計 概月時計 光受容 月光応答

1. 研究開始当初の背景

生物は、地球の自転や公転に伴って生じる周期的な環境変化を予測し、適応する多様なシステムを進化させてきた。大多数の生物は、24時間周期の明暗交代を予測するため、約24時間の周期性をもつ概日時計(circadian clock)を持っている。いくつかの生物には、概日時計に加えて、1日より長い周期の環境変動を計測し生理的に同調する生物がいる。ウズラやヤギといった季節の変化を知る生物は、概日時計を元に1日の長さ(日長)を計測し、季節の変化を知る光周性(photoperiodicity)を発達させている。概日時計と光周性の分子機構は、21世紀に入って詳細な分子解析が飛躍的に進んだ。

生物の中には、約1年や約1ヶ月といった長い周期変化に同調する生物も知られている。たとえば、ヒメマルカツオブシムシやキンイロリスは、季節を知るための光周応答性に加え、次の季節を予測するための概年時計を持つことが古くから知られている。1ヶ月の周期をもつ概月時計は、最近になって一部の生物で存在が確認されたものの研究は極めて少ない。このように、1日より長い時間を計測する長周期時計については、その分子基盤はおろか、単一の細胞にシステムが内在しているのか、あるいは複数の細胞によって構成されるのかすら全く不明である。このように、概日時計以外の生物時計の研究が遅れている主な理由は、2つあり、1つめは「概日時計よりも周期が長いため研究が困難である」こと、もう1つは「モデル実験系・モデル細胞系が存在しない」ことである。

2. 研究の目的

フグやアイゴはそれぞれ、半月および1ヶ月周期の光応答性の産卵行動を示す。すなわち、フグは新月および満月の大潮に合わせて、月齢同調性の産卵行動を示すと考えられている。アイゴには、異なる月齢に同調する複数の種類があり、ゴマアイゴは上弦に合わせて産卵する。このような長周期の光応答現象の分子基盤を明らかにするための第一歩として、トラフグ由来の細胞およびアイゴ個体において、人工月光に反応して遺伝子の変動を示すかを検討し、モデル細胞系・モデル実験系として、長周期時計研究に突破口を開くことを目的とした。

具体的には、トラフグの眼球由来の培養細胞である Fugu Eye 細胞およびゴマアイゴの幼魚を用いることとした。その理由は、研究代表者らはこれまでに、Fugu Eye 細胞が、内在性の概日時計をもち、さまざまな波長の光に反応して紫外線障害修復系の遺伝子の発現量が増大することを見出していたこと[Okano et al. Sci. Rep. 7, 46150 (2017)]、およびアイゴ個体が自然条件下でどのように月光に反応するかを明らかにした[Takeuchi et al. Sci. Rep. 8, 6208 (2018)]ためである。

3. 研究の方法

本研究では、長周期計測現象として月齢同調現象に着目し、月齢応答性を実験室内において再現するため、具体的には、研究対象として、成魚が上弦特異的な月齢同調産卵現象を示すゴマアイゴの幼魚、および大潮特異的な半月周性同調産卵を示すフグの眼球由来の培養細胞 Fugu Eye を用いた。また、これら2種類の魚との比較対象として用いたゼブラフィッシュにおいても眼球特異的に光周期応答性が観察されたため、こちらも研究対象とした。

実験に際し、まずはじめに人工月光再現装置を作製した。光のスペクトルは多数のカラーLEDを用い、測定した月光のスペクトルに近いスペクトルとなるように調整した。光量はPCから制御コマンドを送信し、受信したマイコンが駆動するシステムとした。月齢に応じて月光は光量が変化するが、月の出と月の入時刻も日によって変化し、夜の間でも月の高度に応じて光量が変化する(図1)。このような複雑な変化パターンを再現する装置(月光シミュレータ)を複数作製し、その下で Fugu Eye 細胞の長期培養と人工月光への遺伝子応答性の検証を試みた。アイゴは実験室内で飼育し、新月・上弦・満月・下弦にサンプリングして月齢応答遺伝子また、ゼブラフィッシュを用いた研究では、青色光源による光周期を明期6時間から18時間まで変化させ、その際の時計遺伝子の発現パターンの変動を解析した。

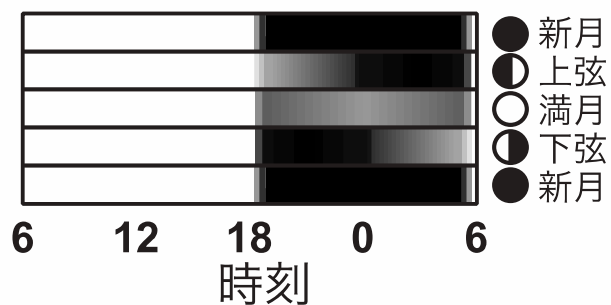


図1 月光の光量変化イメージ

4. 研究成果

Fugu Eye 細胞の培養: Fugu Eye 細胞はフグの眼球由来の培養細胞であり、内在性に概日時計および光応答性をもつ[Okano et al. (2017)]ため、モデル細胞の有力候補であった。将来的に月齢依存的な現象を解析するためには少なくとも1月以上にわたって、細胞を維持できることが必要である。そこでまず、Fugu Eye 細胞がどの程度長期間培養できるかを検討した。細胞密度や培地の交換タイミングなど培養条件を詳細に検討した結果、Fugu Eye 細胞を継代することなく

2ヶ月間維持することに成功した。

Fugu Eye 細胞における月光応答：上記の実験と並行して、Fugu Eye 細胞が人工月光に対して応答できるかどうかを調べた。満月に相当する 0.5 ルクス程度の微弱な明るさの人工月光を数日間照射し、光応答遺伝子の発現量が変化するかを調べた。その結果、紫外線損傷修復系の遺伝子や概日時計遺伝子 *Period* の mRNA レベルが光刺激依存的に増大した。そこでさらに、Fugu Eye 細胞を月光シミュレータ下において長期培養したところ、*Period* 遺伝子の応答性は2ヶ月間維持されることがわかった。

以上の結果から、Fugu Eye 細胞は、月光応答機構の解明のためのモデル細胞として使用できることが明らかとなった。今後は、内在性の概日時計の有無を調べるため、人工月光刺激の後に月光刺激を取り除いた場合の遺伝子発現パターンを詳細に解析する必要がある。

アイゴ個体における遺伝子の光応答：琉球大学竹村明洋先生より供与いただいたゴマアイの幼魚を人工月光下で飼育し、間脳における月齢応答遺伝子 (*zCry3*) の発現変動を調べたところ、自然光下でみられたような月齢依存的な発現振動は見られなかった。このことから、*zCry3* 月齢応答には海水中の成分の変化が必要である可能性や、実験室内での飼育によるストレスが影響したものと推定された。並行して解析していたゼブラフィッシュの眼球での興味深い遺伝子発現挙動が見られたため（次項を参照）その解析に移行した。

ゼブラフィッシュ眼球における光周期検出：ゼブラフィッシュの眼球において、時計遺伝子である *Cryptochrome* の1つ (*zCry1ab*) が朝夕2つのピークを示すことを見出した。研究代表者らはこれまでに、月齢応答の機構は、夜間の月光を含めた明期の時間変化に反応して起こるものであり、光周期応答と同一のメカニズムによるのではないかという仮説を提唱していた [Fukushiro et al. PLoS One 6, e28643 (2011)]。そこで、当初の研究計画をゼブラフィッシュまで広げ、眼球における遺伝子の光応答性を詳細に検討した。明期を6時間から18時間まで変化させた結果、*zCry1ab* 遺伝子の2つのピークは、明期（光周期）の変化に応じてダイナミックに変化した（図2）。この結果より、ゼブラフィッシュの眼球において、*zCry1ab* は光周期識別に関わる時計遺伝子である可能性が考えられた。この結果は、眼球に光周期（季節）を識別する仕組みが存在し、*zCry1ab* 遺伝子はその中核を担う可能性を示唆している [Okano et al. Sci. Rep. 10, 5056 (2020)]。

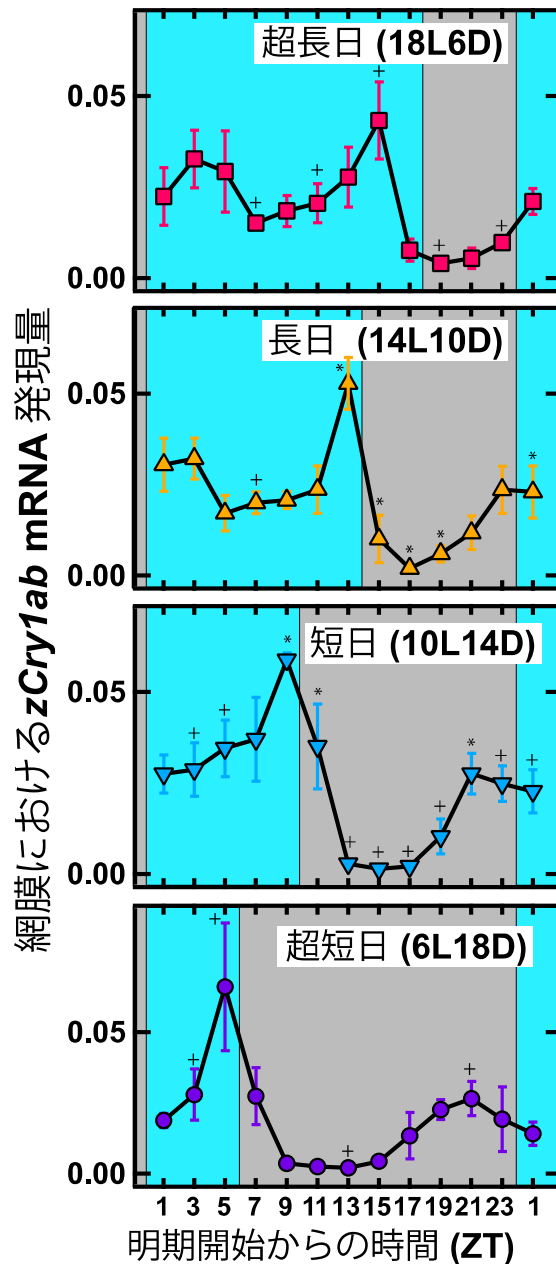


図2 光周期に対する*zCry1ab*遺伝子の発現変動

以上の解析より本研究では、個体レベルでの光周期応答機構解析のモデルとしてゼブラフィッシュ眼球が使えること、細胞レベルでの月光応答機構解析のモデルとして Fugu Eye 細胞が使えることを明らかにすることができた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Kota Miura, Yusuke Tsuji, Hiromasa Mitsui, Takuya Oshima, Yosei Noshi, Yudai Arisawa, Keiko Okano and Toshiyuki Okano | 4. 巻 2 |
| 2. 論文標題 THETA system allows one-step isolation of tagged proteins through temperature-dependent protein-peptide interaction | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Communications Biology | 6. 最初と最後の頁 207 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-019-0457-8 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Yuya Saratani, Yuki Takeuchi, Keiko Okano and Toshiyuki Okano | 4. 巻 37 |
| 2. 論文標題 Clock gene expression in the eye exhibits circadian oscillation and light responsiveness but is not necessary for nocturnal locomotor activity of Japanese loach, <i>Misgurnus anguillicaudatus</i> | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Zoological Science | 6. 最初と最後の頁 177-192 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2108/zs190110 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Keiko Okano, Yuya Saratani, Ayumi Tamasawa, Yosuke Shoji, Riko Toda, Toshiyuki Okano | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 A photoperiodic time measurement served by the biphasic expression of Cryptochrome1ab in the zebrafish eye | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Scientific Reports | 6. 最初と最後の頁 5056 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-61877-4 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件/うち国際学会 2件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 永野杜、岡野恵子、岡野俊行 |
| 2. 発表標題 月光照射装置の作製とトラフグ培養細胞の時計遺伝子発現に対する人工月光の影響 |
| 3. 学会等名 第20回日本光生物学協会年会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yosuke SHOJI, Keiko OKANO, Yuya SARATANI, Toshiyuki OKANO |
| 2. 発表標題 Day length-dependent expression of Cry1b in the zebrafish eye |
| 3. 学会等名 日本比較生理生化学会第40回神戸大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yuya SARATANI, Yuki TAKEUCHI, Keiko OKANO, Toshiyuki OKANO |
| 2. 発表標題 Locomotor activity of Japanese loach (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>) is regulated by environmental light |
| 3. 学会等名 日本比較生理生化学会第40回神戸大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 岡野恵子、永野杜、岡野俊行 |
| 2. 発表標題 トラフグ眼球由来の培養細胞は月光に応答する |
| 3. 学会等名 日本動物学会第89回札幌大会（代替大会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 更谷有哉、竹内悠記、岡野恵子、岡野俊行 |
| 2. 発表標題 ドジョウの行動制御メカニズム解明に向けたトランスクリプトームおよび遺伝子発現解析 |
| 3. 学会等名 日本動物学会第89回札幌大会（代替大会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 東海林洋輔、岡野恵子、更谷有哉、岡野俊行 |
| 2. 発表標題 ゼブラフィッシュにおける日長依存的な遺伝子発現制御機構の解析 |
| 3. 学会等名 日本動物学会第89回札幌大会（代替大会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Toshiyuki Okano |
| 2. 発表標題 VERTEBRATE CRYPTCHROMES: MULTIPLE ROLES IN PHOTORECEPTION, PHOTOPERIODIC TIME MEASUREMENT, AND MAGNETORECEPTION |
| 3. 学会等名 17th International Congress on Photobiology and 18th Congress of the European Society for Photobiology (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 岡野俊行 |
| 2. 発表標題 魚類の時計遺伝子は多様な光環境変化を捉えるために機能分化している |
| 3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会（招待講演） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--------------------------------------|
| 1. 発表者名 東海林洋輔、岡野恵子、更谷有哉、岡野俊行 |
| 2. 発表標題 ゼブラフィッシュ眼球における時計遺伝子の日長応答性 |
| 3. 学会等名 日本動物学会第90回大阪大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 永野杜、岡野恵子、岡野俊行 |
| 2. 発表標題 Fugu Eye細胞への人工月光照射は時計遺伝子発現に影響を与える |
| 3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|-----------------------------------|
| 1. 発表者名 更谷有哉、岡野恵子、青木友悟、岡野俊行 |
| 2. 発表標題 薄明期模倣光源を用いた小型魚類の比較行動解析 |
| 3. 学会等名 異分野融合による次世代光生物学研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yuya Saratani, Keiko Okano, Tomonori Aoki, Toshiyuki Okano |
| 2. 発表標題 Photic regulation of locomotor activity of Cobitidae fish, Japanese loach (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>). |
| 3. 学会等名 17th International Congress on Photobiology and 18th Congress of the European Society for Photobiology (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|--|
| <p>月齢認識機構に関する研究 http://www.okano.sci.waseda.ac.jp/research.html#content_bg</p> |
|--|

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|