

機関番号：18001
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20380114
 研究課題名（和文）潮汐を産卵同期に利用する魚類における干満情報の脳内処理・統合ネットワークの解明
 研究課題名（英文）Physiological studies on transduction of tidal stimuli in the brain of a tropical wrasse
 研究代表者
 竹村 明洋（TAKEMURA AKIHIRO）
 琉球大学・理学部・教授
 研究者番号：40222103

研究成果の概要（和文）：本研究は、潮汐性の日周産卵リズムが顕著に現れる熱帯性ベラ類のミツボシキウセンを主な研究対象種とし、潮汐情報が内因性のリズムに転換される道筋を明らかにした。潮汐（静水圧）変化を実験的に付加した場合、脳内ドーパミン代謝率が低下した。ドーパミン代謝は昼をピークとする日内変動を繰り返しており、この変化はメラトニン投与によっても誘導することができた。魚類ではドーパミンが生殖腺刺激ホルモン放出抑制因子として働いていることが知られているため、日周性と潮汐性刺激によるドーパミン代謝の変化が潮汐性の毎日産卵誘導に関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：The aim of the present study was to clarify how tidal stimuli are transduced endogenous signals in order to repeat daily spawning at high tide. To gain insight into these issues, the involvement of monoamines in mediating endogenous day-night and tidal rhythms in the threespot wrasse, *Halichoeres trimaculatus*, were examined. DA activity increased during the day and decrease during the night for fish held under a natural photoperiod. Intraperitoneal injection of melatonin resulted in a significant reduction in DOPAC/DA. Furthermore, DOPAC/DA was significantly lower in fish held at 3 m compared to 0 m depth, suggesting that hydrostatic pressure influences DA metabolic rate. These results indicate that light and hydrostatic pressure control dopaminergic turnover in the brain of threespot wrasse. Day-night and tidal changes in these two factors therefore may be the main environmental cues the fish uses to synchronize its spawning activity.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：魚類生理学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：潮汐、産卵、ミツボシキウセン、ドーパミン、組織、サンゴ礁

1. 研究開始当初の背景

地球上で繁栄しているすべての生物の活動には周期性がある。地球の公転と自転はそれぞれ一年周期の日長や水温の変化及び24時間周期の明暗の変化として表現され、リズム的な生命活動の基本となっている。月が地球に及ぼす約一ヶ月（月光など）、約2週間（大潮・小潮など）、そして約12.4時間（干満など）の周期も生命活動の同期に重要な要素である。生物を取り巻くこのような環境の周期的な変動が、それぞれの生物に特有の内因性リズムに転換されると思われるが、その詳細についてはほとんど解っていない。

2. 研究の目的

沿岸性の魚類にとって潮汐周期は、産卵や摂餌の時刻あわせを行うための重要な環境要因である。魚が潮汐を感受する機構を明らかにすることができれば、外部環境を利用した性成熟や成長の統御が可能になるかもしれない。本研究では潮汐性のリズムが顕著に現れるサンゴ礁性のベラ科魚類（ミツボシキウセン）を実験材料に用い、潮汐情報が内因性リズムに転換される道筋を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) 研究対象としてサンゴ礁域に広く生息するミツボシキウセンを用いた。ミツボシキウセンは、沖縄本島瀬底島周辺のサンゴ礁域で釣獲し、実験に用いるまで熱帯生物圏研究センター瀬底研究施設の海水掛け流しの水槽で飼育した。
- (2) 瀬底研究施設の大型水槽にケージを設置し、一方を水底（3m）に沈め、他方を水面に保持した。その状態で一定時間保持した後、魚から脳を取り出して冷凍保存した。また、水槽内で飼育した魚の脳を4時間おきに取り出し、同じく冷凍保存した。
生殖腺（卵巣）を取り出し、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）の存在下で培養した。
- (3) 脳内モノアミンは高速液体クロマトグラフィーで分離した後に電気化学的に検出した。卵巣から培養液中に分泌される雌性ホルモン（estradiol-17 β ; E₂）と黄体ホルモン（17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one; DHP）は酵素免疫測定法で測定した。
メラトニン量は時間分解蛍光免疫測定法で測定した。
- (4) 分子生物学的研究手法として、本研究では

2種類の生殖腺刺激ホルモン（FSH と LH）遺伝子、アルギニンバソトシン(AVT) とイソトシン (IT)、そしてモノアミン酸化酵素遺伝子 (MAO) の確遺伝子をクローニングし、それぞれの脳内発現量をリアルタイム PCR で測定した。

4. 研究成果

脳内モノアミンの変化

ミツボシキウセン全脳抽出物中のモノアミン（Dopamine; DA、Serotonin; 5-HT およびそれらの代謝物）量の日周変動を調べた。その結果、5-HT およびその代謝物には日周変化は認められなかった。一方、DA は日入り前後で有意に上昇した。DA の代謝産物（3,4-dihydroxyphenylacetic acid; DOPAC）は昼に高く夜に減少したのに加え、DA の代謝率（DOPAC/DA）も夜に減少した（図1）。DA の代謝率の変化は人為的な恒暗条件下でも継続したため、生物時計の関与が考えられた。網膜内メラトニン量の変化を測定した結果、この値は夜間に高く昼に下がることが判明した。ミツボシキウセンへのメラトニン投与は、脳内 DA 代謝率を減少させたことから、夜間に上昇するメラトニンが DA の代謝に関与している可能性があった。

ミツボシキウセンを水面（0m）と水底（3m）で飼育し、全脳抽出物中の DA 代謝率を比較した。その結果、水底で飼育した魚の DA 代謝率は昼間及び夜間のいずれにおいても

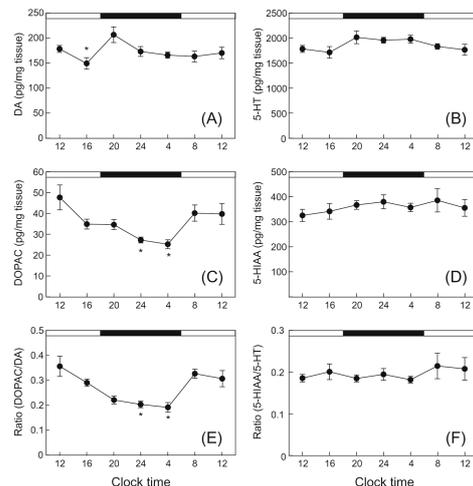


図1. ミツボシキウセンにおける脳内モノアミン量の日周変化。A; Dopamine (DA), B; Serotonin (5-HT), C; 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), D; 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA), E; DOPAC/DA, F; 5-HIAA/5-HT. *は統計的に有意であることを示す。

も水面のそれよりも減少した（図2）。

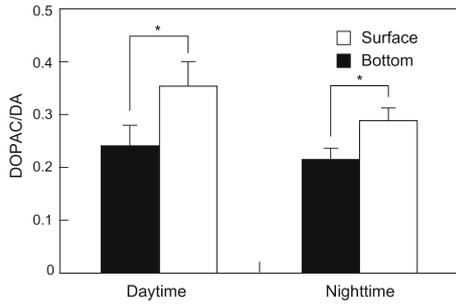


図2. 静水圧変化がミツボシキウセンの脳内ドーパミン代謝率 (DOPAC/DA) に及ぼす影響. 水面 (Surface) と底面 (Bottom) で昼間もしくは夜間6時間飼育した魚の脳内ドーパミン代謝率を測定した. *は統計的に有意であることを示す.

ドーパミン代謝に関連するモノアミン酸化酵素遺伝子の脳内発現量が静水圧付加前後で変化した。

静水圧付加が成熟に与える影響

水面に配置した魚 (対照群) と水底 (水深3m) に配置した魚 (実験群) の脳下垂体中のLHおよびFSH mRNA発現量に違いは見られなかった。生殖腺体指数や卵巣組織像にも水圧付加による変化がみられなかった。一方、実験群と対照群の卵巣片を培養してE₂およびDHP分泌量を測定した結果、水圧付加した魚の卵巣においてDHP分泌量が有意に高くなった。

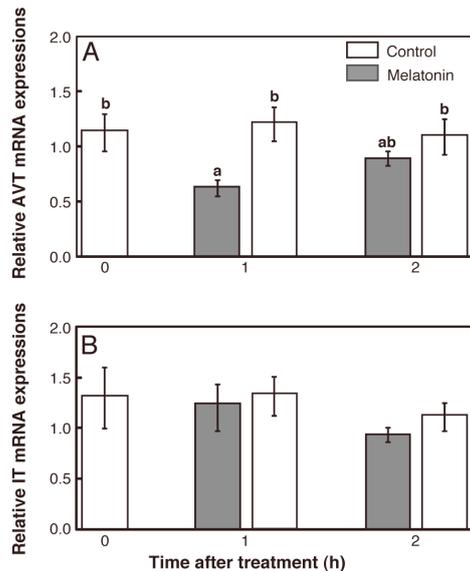


図3. メラトニン投与がミツボシキウセン脳内のアルギニンバソトシン (A) およびイソトシン (B) 発現量に及ぼす効果. メラトニン投与後1及び2時間での変化を調べた. 図中のアルファベットは統計的な有意差を表す.

脳内神経ペプチドホルモン

アルギニンバソトシンとイソトシン遺伝子の脳内発現量は日周変動しており、いずれの遺伝子の発現も昼に高く夜に低くなった。メラトニン投与は脳内アルギニンバソトシン発現量を減少させたことから、メラトニンがアルギニンバソトシンの日周変動を制御している可能性があった (図3)。さらにメラトニンはミツボシキウセンに睡眠様の行動 (遊泳活動の停止と呼吸量の低下) を誘導した。この効果はアルギニンバソトシンを同時投与することによって減衰した。以上の結果から、ミツボシキウセンの日周活動リズムにはメラトニンとアルギニンバソトシンが関与していることが考えられた。

まとめ

ミツボシキウセンの日周活動で特に重要なのはメラトニンとアルギニンバソトシンであり、これらのホルモンは拮抗して働き日周活動を制御している可能性が示された。ミツボシキウセンでは夜間の潜砂による環境光変動からの隔離が安定した睡眠 (休息) を誘導し、この間に受ける潮汐変化 (水圧変化) が潮汐性の毎日産卵活動同期に重要であることが示唆された。夜間のDA代謝の変化は光刺激と潮汐刺激の少なくとも二つの外部環境要因の影響を受けることが明らかになった。

多くの魚類でDAは生殖腺刺激ホルモン放出抑制因子として作用することが知られていることから、日周性や水圧の付加によるDA代謝の変化が脳下垂体における生殖腺刺激ホルモン分泌量が変化し、卵濾胞におけるDHP分泌を促進することによって卵母細胞の最終成熟能獲得に深く関わっている可能性があった。

以上のことからミツボシキウセンの産卵に関して以下の様な仮説が提唱できる。

- (1) 夜の前半に満潮が来る場合、静水圧刺激が日周性刺激に先んじて起こって脳内ドーパミン代謝が低下し、脳下垂体からのLHの分泌を促進する。この場合潮汐性の産卵が強く現れる。
- (2) 夜の後半では日周性によるメラトニンピーク (夜の12時ころ) が潮汐刺激よりも先に来るため、メラトニンによる脳内ドーパミン代謝が低下し、脳下垂体からのLHの分泌を促進する。この場合日周性の産卵が強く表れる。
- (3) 潮汐性の毎日産卵は、定時で繰り返される日周性の変動パターンの上に一日約50分ずつ遅れてくる潮汐性の変動パターンが上書きされることによって引き起こされる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 11 件)

1. Hur SP, Takeuchi Y, Esaka Y, Wambiji N, Park YJ, Kang HC, Jeong HB, Lee YD, Kim SJ, Takemura A. Diurnal expression patterns of neurohypophysial hormone genes in the brain of the threespot wrasse *Halichoeres trimaculatus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, in press. (査読有)
2. 竹村明洋 2010. サンゴ礁生物における共生とは。環境と健康, 23 ; 261-270.
3. 竹村明洋 2010. サンゴ礁に生息する魚類の産卵リズムに及ぼす月の影響。比較内分泌学, 36, 101-106.
4. Takemura A, Rahman MS, Park YJ, 2010. External and internal controls of lunar-related reproductive rhythms in fish. *J. Fish Biol.* 76, 7-26. (査読有)
5. Takemura A, Uchimura M, Shibata Y, 2010. Dopaminergic activity in relation to changes in day-night and hydrostatic pressure in the brain of tropical wrasse *Halichoeres trimaculatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 166, 513-519. (査読有)
6. Nikaido Y, Vijayan MM, Arulu N, McGuire A, Park YJ, Takemura A, 2010. Effect of cortisol on melatonin production in the pineal gland of tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Comp Biochem. Physiol.* 155A, 84-90. (査読有)
7. McGuire A, Aluru N, Takemura A, Weil R, Wilson JM, Vijayan MM, 2009. Hyperosmotic shock adaptation by cortisol involves upregulation of branchial osmotic stress transcription factor 1 gene expression in Mozambique tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 165, 321-329. (査読有)
8. Jeong HB, Park JG, Park YJ, Takemura A, Hur SP, Lee YD, Kim SJ, 2009. Isolation and characterization of DMRT1 and its putative regulatory region in the protogynous wrasse, *Halichoeres tenuispinis*. *Gene*, 438, 8-16. (査読有)
9. Nikaido Y, Ueda S, Takemura A, 2009. Photic and circadian regulation of melatonin production in the Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 152A, 77-82. (査読有)
10. Takemura A, Oya R, Shibata Y, Uchimura M, Nakamura S, 2008. Role of the tidal cycle in the gonadal development and spawning of the tropical wrasse *Halichoeres trimaculatus*. *Zool. Sci.* 25, 572-579.

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 福代真・竹内崇裕・竹内悠記・許成杓・洲鎌望・竹村明洋・久保葉子・岡野恵子・岡野俊行. 月齢周期に応答する熱帯産魚類ゴマアイゴにおける Cry 遺伝子の解析. 第 17 回日本時間生物学会学術大会. 2010 年 11 月 20-21 日. 早稲田大学国際会議場.
2. 中野俊樹・庄子唯・山口敏康・佐藤実・竹村明洋. サンゴ礁域魚ゴマアイゴの生理学的パラメーターに及ぼす外因性コルチゾルの影響. 平成 22 年度日本水産学会秋季大会. 2010 年 9 月 22-25 日. 京都大学総合人間学部.
3. Hur SP, Takeuchi Y, Park YJ, Jeong HB, Wambiji N, Kim SJ, Lee YD, Takemura A. Molecular cloning of neuropeptide hormones and its expression in the brain of threespot wrasse. 平成 22 年度日本水産学会春季大会. 2010 年 3 月 26-30 日. 日本大学生物資源科学部.
4. 柴田より子・内村美幸・許成杓・竹村明洋. 静水圧変化がミツボシキウセンの脳内モノアミンおよび生殖活性に及ぼす影響. 平成 22 年度日本水産学会春季大会. 2010 年 3 月 26-30 日. 日本大学生物資源科学部.
5. 庄子唯・中野俊樹・亀田真澄・山口敏康・佐藤実・竹村明洋. サンゴ礁域魚類ゴマアイゴのストレスタンパク質の発現に及ぼすヒートショックの影響. 平成 22 年度日本水産学会春季大会. 2010 年 3 月 26-30 日. 日本大学生物資源科学部.
6. 竹村明洋. サンゴ礁の不思議な共生関係. 第 15 回いのちの科学フォーラム. 2010 年 2 月 6 日. 京大会館.
7. Shibata Y, Uchimura Y, Hur SP, Takemura A. Effect of environmental cues on changes in monoamine contents in the brain of a tropical wrasse *Halichoeres trimaculatus*. 第 7 回東シナ海海洋学及び水産学に関する国際ワークショップ. 2009 年 12 月 4-5 日. 上海海洋大学.
8. Hur SP, Takeuchi Y, Park YJ, Jeong HB, Park JG, Song KS, Wambiji N, Kim SJ, Lee YD, Takemura A. Molecular characterization of arginin vasotocin and its expression patterns in the threespot wrasse, *Halichoeres trimaculatus*. 第 7 回東シナ海海洋学及び水産学に関する国際ワークショップ. 2009 年 12 月 4-5 日. 上海海洋大学.
9. 柴田より子・内村三幸・許成杓・竹村明洋. 生息環境変化がミツボシキウセンの脳内モノアミンに及ぼす影響. 日本サンゴ礁学会第 12 回大会. 2009 年 11 月

- 27-29 日. 本部町中央公民館.
10. 竹村明洋 (2009). サンゴ礁に生息する魚類の産卵リズムに及ぼす月の影響. シンポジウム「生物リズムをあやつる情報伝達分子研究の新展開」第 34 回日本比較内分泌学会大会. 2009 年10月22-24 日. 千里ライフサイエンスセンター.
 11. 福代真・竹内崇裕・洲鎌 望・竹村明洋・久保葉子・岡野恵子・岡野俊行. 月齢応答性をもつゴマアイゴにおける Cry3 の同定および発現解析. 日本比較生理生化学会第31回大会. 2009 年 10 月 22-24 日. 千里ライフサイエンスセンター.
 12. 庄子唯・中野俊樹・山口敏康・佐藤 実・竹村明洋 (2009). サンゴ礁域性魚類ゴマアイゴのストレス応答におけるヒートショックの影響. 平成 21 年度日本水産学会秋季大会. 2009 年 9 月 30 日-10 月 3 日. 岩手県民情報交流センターアリーナ.
 13. 下山紗代子・竹村明洋. ゴマアイゴ脳下垂体におけるメラトニン受容体遺伝子の発現. 平成 21 年度日本水産学会春季大会. 2009 年 3 月 27-31 日. 東京海洋大学.
 14. 伊藤瞳・朴龍柱・竹内悠記・朴智権・竹村明洋. ベラ科魚類における日周活動開始の分子機構-時計遺伝子による時刻合わせ-. 平成 20 年度琉球大学 21 世紀 COE 成果報告会. 2009 年 3 月 14 日. 琉球大学.
 15. 竹村明洋・大角玉樹・今井秀行. 環境を利用して環境を守る:サンゴ礁生物利用した沖縄型アクアヒーリング産業創生. 沖縄産学官イノベーションフォーラム 2008. 2008 年 12 月 3 日. 沖縄産業支援センター.
 16. 伊藤瞳・朴龍柱・竹内悠記・竹村明洋・朴智権. ミツボシキウセンにおける潜砂行動と時計遺伝子発現の日周変化. 第 27 回日本動物行動学会. 2008 年 9 月 24-26 日. 金沢大学.
 17. 朴智権・内村三幸・朴龍柱・竹村明洋. ミツボシキウセンの脳内における Tyrosine hydroxylase の発現解析. 第 79 回日本動物学会. 2008 年 9 月 5-7 日. 福岡大学.
 18. Kim SY, Lim BS, Hur SP, Lee TJ, Ryu YW, Park YJ, Kim SJ, Takemura A, Lee YD. Daily spawning cycle with tidal rhythm of motleystripe rainbowfish *Halicoeres tenuispinis*. World Aquaculture 2008. 2008 年 5 月 19-23 日. Busan Exhibition and Convention Center.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:
 国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年月日:
 国内外の別:

[その他]

ホームページ等

<http://www.takemura-lab.jp/index>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹村 明洋 (TAKEMURA AKIHIRO)

琉球大学・理学部・教授

研究者番号: 40222103