

機関番号：14602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2010

課題番号：20570068

研究課題名（和文） 光感覚性松果体における「明暗」及び「色」情報の生体への作用とその神経経路

研究課題名（英文） In photosensory pineal organ, the functions of luminosity and chromatic signals and their afferent pathways.

研究代表者 保 智己 (TAMOTSU SATOSHI)

奈良女子大学・大学院人間文化研究科・准教授

研究者番号：60188448

研究成果の概要（和文）：松果体と副松果体の神経節細胞は脳の3か所に投射しており、特に松果体は脳の深部にまで軸索を伸ばしていた。最も背側の投射部位では脊髄へ投射している巨大ニューロンの樹状突起と結合していた。さらに電気生理学的な実験からこの経路が波長（「色」）情報を伝達していることが示唆された。また、波長識別に関与する緑光受容細胞の視物質も紫外光受容細胞と同様に光再生している可能性が示された。明暗情報に関しては少なくとも遊泳活動リズムへの関与が示された。

研究成果の概要（英文）：Pineal and parapineal ganglion cells projected on three areas of the mid-brain. Some terminals of them which reached at most dorsal area were contact the dendrites of giant neuron projecting to spinal cord. The pineal neurons extended deeper area of the brain than the parapineal. On the luminosity signal, it was demonstrated that the pineal complex took part in the locomotor activity rhythm, daily and circadian rhythms, in the far eastern brook lamprey.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：松果体、感色性応答、非感色性応答、神経節細胞、紫外光受容、パラピノプシン

1. 研究開始当初の背景

下等脊椎動物（無羊膜類）の松果体には光情報を中枢へ伝達する2種類の神経節細胞が存在することが古くから知られている。一つは非感色性神経節細胞でこの細胞は可視光域の光刺激に対してどの波長においてもインパルスの抑制が見られるいわゆる非感

色性（Luminosity）型の応答を示す。それに対してもう一方の神経節細胞は可視光域（中～長波長光）に対してはインパルスの増大（興奮性）、紫外光に対してはインパルスの減少（抑制性）が見られる。つまり感色性（Chromatic）型の応答を示す。前者は明暗情報のみを後者は波長情報を伝達している

ことになる。これらの光応答の存在は前述したように古くから知られており、それぞれの光応答特性などに関する研究は数多くなされている。しかしながら、これらの応答が個体に対してどのような影響を及ぼしているのかについては推測の域に留まっていた。特に感色性応答に関してはその意義が古くから議論されていたが、実証されることはなかった。

2. 研究の目的

本研究ではこの感色性応答、つまり波長識別の情報と非感色性応答、明暗情報が個体にとってどのような意義を持ち、またその神経経路を明らかにすることである。特に、感色性応答に関与する紫外光受容細胞の光受容タンパク質であるパラピノブシンは光再生を起こす *bistable pigment* である。そのことも踏まえ、感色性応答の役割を明らかにする。また、明暗情報に関しては松果体と活動リズムとの関連が古くから知られている。特に本研究でも材料の一つであるカワヤツメでは光環境因子を受容するだけでなく、概日リズムの形成にも松果体が重要な役割をはたしていることが報告されている。そこで、遊泳活動の日周リズムや概日リズムについてのその特性を検討する。さらに、これまでの松果体の研究では松果体についてのみ検討されてきたが、ヤツメウナギでは松果体の直下に副松果体が存在している。それゆえ、副松果体の機能についても検討する。

3. 研究の方法

実験材料：カワヤツメ (*Lethenteron japonicum*) とスナヤツメ (*Lethenteron reissneri*) を用いた。前者は江別漁協から購入、後者は琵琶湖周辺より採集した。行動リズムの解析にはスナヤツメのみを対象とした。

実験方法：

- (1) 神経トレーサー法：神経トレーサーとしてはニューロビオチンとテトラメチルローダミンを用いた。前者は脊髄へ、後者は松果体へ注入した。また、ニューロビオチンは電気生理学的に細胞内記録をした細胞への注入にも用いた。
- (2) 細胞内記録法：ニューロビオチン溶液を充填したガラス微小電極を用い、光応答を記録したのちに電気泳動的に細胞内に注入し、記録した細胞を同定した。
- (3) 細胞外記録法：松果体神経節細胞の光応答は金属電極またはガラス微小電極を用いて、記録した。
- (4) 多点電極記録法：中脳からの光応答には多点電極記録装置 (MED64, Panasonic) を用いた。
- (5) 遊泳活動リズム：赤外線センサーを用い、横切った回数をカウントした。赤外線セ

ンサーを取り付ける位置はスナヤツメの遊泳活動をビデオカメラで撮影し、その映像をもとに決めた。

4. 研究成果

研究成果は各年度毎に述べる。

平成20年度

組織学的な実験、電気生理学的な実験に加えて、行動リズムの解析に関しても実験を開始した。次にそれらの成果を述べる。松果体からの神経性出力は主として中脳の3か所に投射していることを明らかにした。この3ヶ所の内、最も背側部では脊髄に投射している神経細胞の樹状突起と接触していることを示した。両者が接触している部位には副松果体からの求心性神経の投射も見られた。松果体からの求心性神経線維は後交連近傍で左右に分岐していた。この分岐後に左右に存在する介在性ニューロンと接触していた。脊髄に投射しているこの介在性ニューロンからの光応答の細胞内記録は未だ得られていないが、細胞外記録ではこのニューロンと思われる位置から光応答を例数は少ないが得ることに成功した。

平成21年度に予定していた行動リズムの解析を1年早く準備に取り掛かった。予備実験で撮影していた活動を記録したビデオを観察し、スナヤツメ幼生の遊泳行動の特徴から水槽及びセンサーの設置位置を決定した。まずはアナログでの記録を行い、ビデオ観察と同様なリズムを示すかどうか確認した。その後、パソコンによる遊泳行動の活動を記録・解析できるようなシステムを立ち上げた。最初に12L12Dの光周期に対するスナヤツメ幼生の日周リズムを調べた。その結果、スナヤツメ幼生でもこれまでのカワヤツメと同様に夜行性の活動リズムを示した。次に恒暗条件下でも調べた。恒暗条件では24時間よりも長い周期のリズムを示した。

平成21年度

神経細胞の投射及び分布：前年度明らかとなった松果体複合体からの神経経路は左右の中脳に投射していることが示された。そこで、まずはこの経路の左右差について調べた。その結果、左右に投射している神経細胞は松果体において特に偏りは見られなかった。そのことを確認するために、松果体を4つに分割し、その分布を統計的に調べた。その結果、中脳の左右に投射している神経細胞は松果体にランダムに分布していた。加えて、松果体腹側部での分布では一見、尾側に多く存在するように思われたが、統計的に有意な差は見られなかった。また、松果体神経節細胞は副松果体神経節細胞に比べて、中脳のかなり深部（または尾側）まで投射していることが示唆された。

電気生理学的実験（光応答）：松果体を構成

する様々な細胞からの光応答を記録した。細胞内記録の実験から、緑色光よりも赤色光の方に感受性が高い光受容細胞や松果体終末囊の腹側部において脱分極性応答を示す介在性ニューロンからの光応答の記録に成功した。特に、後者は光強度などに関係なく脱分極性応答を示すニューロンとしては松果体では初めてである。これまで松果体では光強度に依存して脱分極性応答を示すニューロンの存在は報告されていた。このニューロンは感色性応答に関与する可能性も考えられる。

遊泳活動リズム：今年度の目標の一つであったよりスナヤツメ幼生の概日時計の周期については2カ月以上の記録が可能となり、その結果 τ は24.7時間であった。成体もほぼ同じであり、スナヤツメの遊泳活動リズムの周期は約25時間であることが明らかとなった。また、成体と側眼を有しない幼生では明らかに日周周期への同調は成体の方が明瞭であった。このことから側眼が同調に関与しているとも考えられるが、カワヤツメでの結果から考えると側眼によるマスキングによるものであると考えられる。

平成22年度

電気生理学の実験：脊髄からの感色性応答は記録できていないが、松果体からの感色性応答において興味深い結果が得られた。紫外光の長時間照射においては、抑制効果は1～2分で消失する。これはパラピノプシンが紫外光のみの照射であるために退色する結果であると考えられる。感色性応答における緑色光による興奮のメカニズムは未だ解明されていない。感色性神経節細胞からの応答において、緑色光の長時間露光ではインパルスの増加が6分間の照射でも減少することはなかった。このことは興奮性応答においても、抑制性応答にかかわるパラピノプシンと同じようなbi-stableな特性を持った視物質が関与している可能性が考えられる。

遊泳活動リズム：昨年度の研究からスナヤツメの行動リズムの周期はカワヤツメとは異なり、24時間よりも長いことが示された。しかしながら、行動リズムの周期は測定方法によっても異なることが知られている。スナヤツメでは赤外線センサーを横切る回数をカウントしているが、カワヤツメでは、カワヤツメを入れた筒の動きを張力センサーで検出していた。そこで、スナヤツメでも同様な装置を作製し、実験を行った。その結果、赤外線センサーでの測定と同様に24時間よりも長かった。このことより、スナヤツメとカワヤツメの概日リズムの周期の違いは種の違いによるものであることが明らかとなった。環境光の明暗サイクルへの同調を調べた結果、皮下にある側眼の摘出では影響はなかったが、松果体摘出によって同調されなくなった。興味深いことは松果体のみを摘出

した個体において、明期に活動が活発になる個体が見られた。これによって、皮下に存在する側眼であって何らかの機能を果たしていることが示唆された。しかしながら、すべての個体ではなかったため、摘出の程度を詳細に調べる必要がある。これまでの行動リズムの研究からヤツメウナギでは成体および幼生においても概日リズムの時計は松果体と密接な関係にあり、環境光への同調に関しても松果体が必要不可欠であることが示された。環境光からの「明暗」情報は松果体を經由して、時計情報と共にヤツメウナギの行動を制御していることが示唆された。

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. Kawano-Yamashita E., Koyanagi M., Shichida Y., Oishi T., Tamotsu S., and Terakita A. Evolutionary Linkage of Photopigment and Arrestin: Beta-arrestin Functionally Regulates the Non-bleaching Pigment Parapinopsin in Lamprey Pineal. PLoS ONE 6(1): e16402 (2011). 査読有
2. Itami S., Tamotsu S., Sakai A., and Yasuda K. The roles of Thy-1 and integrin β_3 in cell adhesion during theca cell layer formation, and the effect of follicle-stimulating hormone on Thy-1 and integrin β_3 localization in mouse ovarian follicles. Biology of Reproduction 84:986-995 (2011). 査読有
3. Takemura A., Tamotsu S., Miwa T. and Yamamoto H. Preliminary Results on the Reproduction of a Deep-sea Snailfish around the Active Hydrothermal Vent on the Hatoma Knoll, Okinawa, Japan. J. Fish Biol. 77(7):1709-1715 (2010). 査読有
4. Kondo M., Tokura H., Wakamura T., Hyun K.-J., Tamotsu S., Morita T., and Oishi T. Influences of Twilight on Diurnal Variation of Core Temperature, Its Nadir, and Urinary 6-Hydroxymelatonin Sulfate During Nocturnal Sleep and Morning Drowsiness. Coll. Antropol. 33:193-199 (2009). 査読有

[学会発表] (計27件)

1. 保智己: ヤツメウナギ松果体の光感

- 覚について (第11回光生物シンポジウム 2010年10月10日 島根)
2. 加藤 遥、木村奈々、鮫島道和、保智己 : ヤツメウナギ幼生及び成体における遊泳活動リズム (第81回日本動物学会 2010年9月25日 東京)
 3. 保智己、清家晴子、中村愛理子、島 恵子、木村奈々 : 無顎類スナヤツメ及びカワヤツメ松果体の組織学的及び生理学的特性の比較 (第31回日本比較生理生化学会 2009年10月23日 大阪)
 4. 山下 (川野) 絵美、小柳光正、七田芳則、大石 正、保智己、寺北明久 : ヤツメウナギ松果体光受容細胞で機能する2種類のアレスチンの役割 (第31回日本比較生理生化学会 2009年10月23日 大阪)
 5. 山下 (川野) 絵美、小柳光正、七田芳則、大石 正、保智己、寺北明久 : パラピノプシンが機能する松果体紫外光受容細胞でのアレスチンの役割 (第80回日本動物学会 2009年9月19日 静岡)
 6. 木村奈々、吉川由紀子、鮫島道和、保智己 : 無顎類スナヤツメにおける遊泳活動の日周及び概日リズム (第80回日本動物学会 2009年9月17日 静岡)
 7. 山下 (川野) 絵美、保智己、小柳 光正、大石 正、七田 芳則、寺北 明久 : ヤツメウナギの松果体 UV 光受容細胞でパラピノプシンと共局在するアレスチンの同定 (第79回日本動物学会 2008年9月6日 福岡)
 8. 保智己、奥山 史、永井 公美、清家晴子 : ヤツメウナギ松果体における神経節細胞の組織化学的研究 (第79回日本動物学会 2008年9月6日 福岡)
 9. 島 恵子、大石 正、鮫島 道和、保智己 : ヤツメウナギにおける松果体-脊髄間の伝導路の解明 (第79回日本動物学会 2008年9月6日 福岡)

[図書] (計 2件)

1. 保智己 「第3の眼」松果体 日本生理生化学会 (編 「見える光、見えない光-動物と光のかかわり」 共立出版 pp. 134-153 (2009)

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者 保智己 (TAMOTSU SATOSHI)
奈良女子大学・大学院人間文化研究科・准教授
研究者番号 : 60188448