

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14602

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24570086

研究課題名(和文)脊椎動物における「第4の眼」室傍器官の機能及び神経機構の解明

研究課題名(英文) Study for the function and neural mechanism of the paraventricular organ in the vertebrates.

研究代表者

保 智己 (Tamotsu, Satoshi)

奈良女子大学・自然科学系・教授

研究者番号：60188448

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：室傍器官は間脳第三脳室に存在する脳室周囲器官の一つである。本研究において、両生類、硬骨魚類、円口類の脳には室傍器官が存在し、室傍器官はGnIHニューロンやGnRHニューロンを介して下垂体と神経連絡していた。また、ナメクジウオにおいても室傍器官を構成するセロトニン陽性脳脊髄液接触ニューロンと類似した細胞が前頭器官周辺に見られた。これらのことは室傍器官が哺乳類以外の脊索動物は持つ器官であり、さらに下垂体との関連は共通した機能であることを示唆するものである。しかしながら、室傍器官の機能については未だ不明である。

研究成果の概要(英文)：The paraventricular organ is one of the circumventricular organs in the diencephalon. In this study, there was paraventricular organ in the brain of clawed frog (Amphibia), redspotted masu trout (Teleostei) and lamprey (Cyclostomata). Their paraventricular organ formed the neural connection to the pituitary gland through the GnIH (gonadotropin-inhibitory hormone) neurons and/or the GnRH (gonadotropin-releasing hormone) neurons. In addition, the serotonin-immunoreactive cells which were similar to the cerebrospinal fluid contacting neurons of the vertebrate were found around the frontal eye in the amphioxus. These suggest that the chordate except mammals possess the paraventricular organ, which make a neural network with the pituitary gland. However, the function of the paraventricular organ is still unknown.

研究分野：感覚生理学

キーワード：室傍器官 GnIH GnRH 脳脊髄液接触ニューロン

## 1. 研究開始当初の背景

室傍器官の存在は古くから知られており、室傍器官を構成する脳脊髄液接触ニューロンが感覚性の細胞であることは報告されていたが、その働きについてはほとんど報告がなかった。応募者の研究グループがウズラにおいて室傍器官と下垂体との関連について言及した (Haida et al. 2004)。さらに、続けて爬虫類カナヘビにおいても室傍器官と下垂体さらには概日時計との関連についても明らかにした (Kawano et al. 2006)。室傍器官が脳深部光受容器官であることはウズラにおいてはそれまでに免疫組織学的に室傍器官が光受容器官であることが示唆されていたが、この研究において、光周期 (短日-長日条件) によって室傍器官の細胞数が変化することを示した。また、カナヘビにおいては室傍器官の脳脊髄液接触ニューロンにおいて視細胞に特異的であるトランスデュースンの抗体に対して陽性反応を示した。しかしながら、これらのニューロンが本当に光受容を行っているかどうかについては明らかにされてこなかった。しかしながら、昨年、鳥類 (ウズラ、ニワトリ) において室傍器官に *Opn5* (ニューロプシン) が発現していることが2つの研究グループからほぼ同時に発表された。

## 2. 研究の目的

本研究では哺乳類を除く脊椎動物に存在する室傍器官がウズラやカナヘビで見られたように室傍器官-下垂体系を形成しているかどうかを調べる。さらにこれまでの応募者の研究では室傍器官-下垂体系では新規の RF アミド関連ペプチドである LPXRFamide ペプチドグループである GnIH (ゴナドトロピン放出抑制ホルモン) と GnRH (ゴナドトロピン放出ホルモン) が中継ニューロンとしていたが、これのペプチドニューロンとの関連についても脊椎動物において広く普遍的な

ものであるかどうかを検討する。そのために対象とする動物は入手や飼育方法が確立されている比較的一般的なものを選択する。両生類ではイモリ、加えて将来的に遺伝子レベルでの解析を考慮し、ツメガエルについても調べる。魚類ではキンギョ及びメダカを対象とする。また、最も原始的な脊椎動物であり、応募者の研究室において、眼外光受容器官の解析が行われてきているヤツメウナギ (スナヤツメ及びカワヤツメ) を用いる。さらに脊椎動物ではないが、原索動物であるナメクジウオについても室傍器官に相当するものが存在するかどうかについても検討する。さらにこれに同時に室傍器官が本当に光受容能を有しているかどうかについて、電気生理学的手法を用いて、直接的に証明する。室傍器官を構成している脳脊髄液接触ニューロンは長い軸索を有しており、活動電位の記録も期待できる。これについては実体顕微鏡下で室傍器官が認識でき、さらに組織学的な研究から光受容器官である可能性が高いカナヘビを用いる。カナヘビの室傍器官を構成する脳脊髄液接触ニューロンの先端には9+2構造の繊毛が存在することは確認済みである。そこでこの細胞への細胞内記録を試みる。細胞内記録によって、光応答を記録した後に細胞内に電気泳動的に色素を注入し、記録細胞の同定を行う。加えて、室傍器官の機能を検討するために光周期や波長が及ぼす影響、特に生殖腺等への影響について検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 脊索動物における室傍器官

アフリカツメガエル、ヒメダカ、アマゴ、カワヤツメ、スナヤツメ、ナメクジウオについて調べた。

それぞれの動物から脳を摘出し、固定後、凍結切片を作成して、抗セロトニン抗体を用いて、蛍光免疫染色を施し、蛍光顕微鏡及び

共焦点レーザー顕微鏡を用いて、観察した。

抗セロトニン抗体と抗 GnIH 抗体 and/or 抗 GnRH 抗体で二重標識し、室傍器官と2種類のニューロンとの関連を調べた。

#### (2) 光周期の室傍器官への影響

カナヘビおよびスナヤツメを用いた。

カナヘビを短日(8L:16D)と長日(16L:8D)で飼育した。スナヤツメは小型(5 cm未滿)、中型(5~8 cm)、大型(8 cm以上)個体を、短日条件(12L:12D)と長日条件(16L:8D)で飼育した。

明期の真ん中で断頭し、脳を摘出、固定した。固定した後に連続凍結切片を作成し、カナヘビは抗セロトニン抗体で蛍光免疫染色し、間脳部のセロトニン陽性反応を全て撮影し、解析した。また、スナヤツメにおいては抗セロトニン抗体と抗 GnIH 抗体で二重標識し、カナヘビと同様に解析した。解析には Image J を使い、セロトニン免疫陽性反応を示す領域及び微分干渉像から脳全体の面積を測定した。

#### (3) 光周期の生殖腺への影響

カナヘビを用いた。

短日(8L:16D)と長日(16L:8D)で飼育したカナヘビの体重と生殖腺重量を測定し、GSI(Gonadosomatic index)を求めた。

#### (4) 光周期の変態への影響

スナヤツメの幼生から変態への光周期の影響を調べた。

大型のスナヤツメを短日(8L:16D)と長日(16L:8D)で6か月間、一定温度(16 )で飼育し、その間に変態し成体になった個体数をカウントした。

#### (5) 室傍器官の光応答

カナヘビおよびスナヤツメを用いた。後述するオプシンの発現が確認されたので、当初予定していなかったスナヤツメを主として調べた。

脳を摘出し、電動マイクロマニピュレーターを用いて、ガラス微小電極を実体顕微鏡

下で脳内に刺入し、光照射し、アンプで増幅後記録した。

#### (6) スナヤツメの脳に発現するオプシンの同定

スナヤツメ幼生の脳を松果体をのぞいて摘出し、できる限り間脳以外の脳組織を取り除いた。

totalRNA を抽出し、これをもとに cDNA を作成した。

Opn5 特異的なプライマーを用いて、PCR を行い、シークエンスし、その結果からアミノ酸配列の一部を決定した。

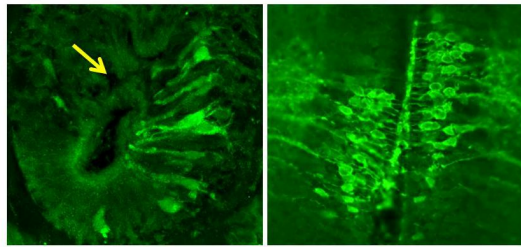
## 4. 研究成果

### (1) 脊索動物における室傍器官

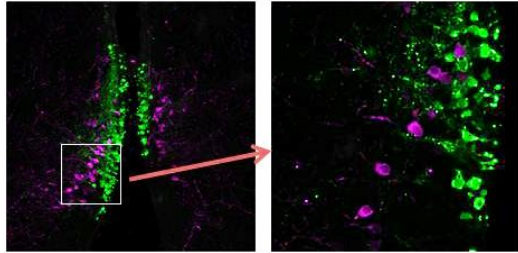
アフリカツメガエル、ヒメダカ、アマゴ、カワヤツメ、スナヤツメ幼生及び成体において、セロトニン陽性脳脊髄液接触ニューロン群の存在が確認された。

アマゴ、スナヤツメ、カワヤツメではセロトニン陽性神経線維が GnIH 陽性ニューロンに varicosity で接触していた。また、アフリカツメガエルでは GnRH 陽性ニューロンとの接触が確認された。スナヤツメ成体では強い GnRH 陽性反応を示す正中隆起にセロトニン陽性神経線維が投射していることが確認された。これらのことは室傍器官のセロトニン陽性細胞が GnIH ニューロンや GnRH ニューロンへ脳室内の何らかの環境因子を伝達していることを示唆するものである。

ナメクジウオにおいては脳胞の2ヶ所にセロトニン陽性細胞群が確認できた。そのうちの前頭眼の色素周辺部のセロトニン陽性細胞は脊椎動物の脳脊髄液接触ニューロンに形態が似ていた。更に、下垂体原基であると言われているハチェック窩背側部にセロトニン陽性線維束が見られた。また、GnIH 陽性神経線維がハチェック窩に確認された。

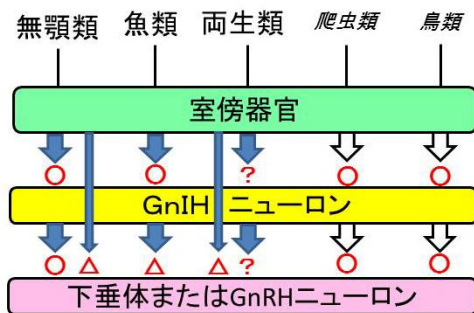


ナメクジウオ前頭眼(→)のセロトニン陽性細胞  
スナヤツメ脳室周辺部のセロトニン陽性脳脊髄液接触ニューロン



アマゴ前額断面 セロトニン-GnIH免疫二重染色  
マゼンタ:セロトニン陽性反応 緑:GnIH陽性反応

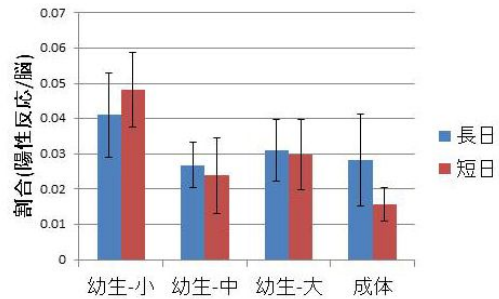
これらの結果から室傍器官は哺乳類を除く脊椎動物に広く存在し、それらの多くはGnIHニューロンとの関連が強いことを示している。多くの動物において、GnIHニューロンと下垂体との関連が報告されている。つまり、室傍器官はGnIHニューロンを介するか、あるいは直接下垂体へ信号を伝達していることを示唆するものである。



## (2) 光周期の室傍器官への影響

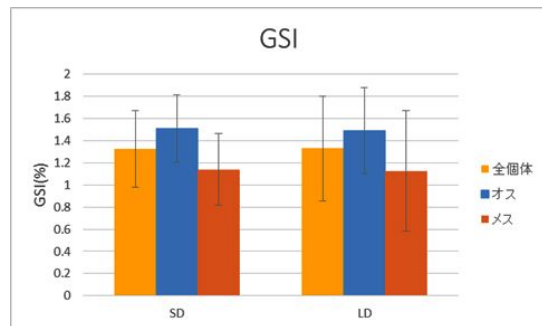
カナヘビにおいては短日条件と長日条件でセロトニン陽性反応に違いは見られなかった。また、スナヤツメにおいても成体においては短日条件で陽性反応の脳に対する割合が小さい傾向が見られたが、有意な差は認められなかった。しかしながら、ステージ間では小型幼生と成体では有意に小型幼生の方がセロトニン陽性反応の割合が大きかった。

GnIH 陽性反応においても同様な結果が得られた。



## (3) 光周期の生殖腺への影響

長日と短日条件で飼育したカナヘビのGSIを比較したが、両条件での差は認められなかった。しかしながら、本研究ではカナヘビが野生での採集に頼ったために様々なステージの個体を用いることになった。そのために影響が出なかった可能性もある。



## (4) 光周期の変態への影響

短日条件と長日条件において、変態する個体の差は見られなかった。この結果において興味深いことは6か月間もの長期にわたり、短日・長日条件に曝されたにも関わらず、自然界で変態が起こる11月~12月にかけて多く個体の変態した。さらに詳細に調べる必要があるが、この観察結果は変態が光条件でも温度条件でもない、別の要因で決められている可能性を示しているのかもしれない。

## (5) 室傍器官の光応答

当初、カナヘビを主に用いる予定であったが、安定した供給ができなくなったことと、スナヤツメ間脳にOpn5(ニューロプシン)が発現していることが示唆されたことから、スナ

ヤツメを中心に細胞内記録を試みたが、光応答の記録には成功しなかった。また細胞外記録も試みたが、同様な結果であった。この実験からだけで、光応答を示さないと結論付けることはできないので、さらなる実験が必要であると考え。

(6) スナヤツメの脳に発現するオプシン  
ウズラの室傍器官に発現している Opn5 がスナヤツメ幼生の間脳において発現していた。このことはヤツメウナギにおいても室傍器官が脳深部光受容器官である可能性を示しているのかもしれない。

## 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9件)

Mikata Y., Takekoshi A, Kizu A, Nodomi Y, Aoyama M, Yasuda K, Tamotsu S, Konnod H and Burdette SC. 8-TQEN(N,N,N,N-tetrakis(8-quinolylmethyl)ethylenediamine) analogs as fluorescent cadmium sensors: strategies to enhance Cd<sup>2+</sup>-induced fluorescence and Cd<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> selectivity. RSC Advances 査読有 4(25):12849-12856 (2014)

Maeda T, Tamotsu S, Iwasaki M, Nisimura T, Shimohigashi M, Hojo MK, Ozaki M. Neuronal projections and putative interaction of multimodal inputs in the subesophageal ganglion in the blowfly, *Phormia regina*. Chem. Sense 査読有 39(5):391-401 (2014)

Mikata Y, Takeuchi S, Konno H, Iwatsuki S, Akaji S, Hamagami I, Aoyama M, Yasuda K, Tamotsu S, Burdette SC. Bis (2-quinolylmethyl) ethylenediamine- diacetic acids

(BQENDAs), TQEN-EDTA hybrid molecules as fluorescent zinc sensors. Dalton Trans 査読有 43(26) 10013-10022 (2014)

Mikata Y, Kawata K, Takeuchi S, Nakanishi K, Konno H, Itami S, Yasuda K, Tamotsu S, Burdette SC Isoquinoline-derivatized tris(2-pyridylmethyl)amines as fluorescent zinc sensors with strict Zn<sup>2+</sup>/Cd<sup>2+</sup> selectivity. Dalton Trans 査読有 43(28): 10751-10759 (2014)

Ishino, M., Faenov, A.Y., Tanaka, M., Tamotsu, S., Hasegawa, N., Nishikino, M., Pikuz, T.A., Kaihori, T., Kawachi, T. Observations of surface modifications induced by the multiple pulse irradiation using a soft picosecond x-ray laser beam. Applied Physics A 査読有 110:179-188 (2014)

Takusagawa M, Tamotsu S and Sakai A Histone H3 is absent from organelle nucleoids in BY-2 cultured tobacco cells. Cell Biology International 査読有 37(7):748-754 (2013)

Sato, T, Watanabe, K, Tamotsu, S, Ishikawa, A, Schmidt-Rhaesa, A. Diversity of nematomorph and cohabiting nematode parasites in riparian ecosystems around the Kii Peninsula, Japan. Canadian Journal of Zoology 査読有 90(7):829-838 (2012)

Mikata, Y., Ugai, A., Yasuda, K., Itami, S., Tamotsu, S., Konno, H., Iwatsuki, S Quinoline-based, glucose-pendant fluorescent zinc probes. Chemistry and Biodiversity 査読有 9(9):2064-2075 (2012)

Norman, G., Starikov, S., Stegailov, V., Fortov, V., Skobelev, I., Pikuz, T., Faenov, A. , Tamotsu, S., Kato, Y., Ishino, M.,

Tanaka, M., Hasegawa, N., Nishikino, M., Ohba, T., Kaihori, T., Ochi, Y., Imazono, T., Fukuda, Y. Nanomodification of gold surface by picosecond soft x-ray laser pulse. Journal of Applied Physics 査読有 112(1):013104 (2012)

〔学会発表〕(計 13 件)

保智己, 土井穂波, 鎌野旭海, 加藤遥, Ferdousi Hoque. 無顎類スナヤツメ幼生の遊泳活動リズム第 85 回日本動物学会 2014 年 9 月 宮城

山下(川野)絵美, 小柳光正, 和田清二, 保智己, 寺北明久 円口類ヤツメウナギの脳深部に発現する非視覚オプシンの組織学的解析 第 85 回日本動物学会 2014 年 9 月 宮城

和田清二, 山下(川野)絵美, 保智己, 小柳光正, 寺北明久 ヤツメウナギ松果体の波長識別に関わる光受容細胞の解析 第 85 回日本動物学会 2014 年 9 月 宮城

尾崎まみこ, 前田徹, 保智己, 岩崎雅行, 西村知良, 下東美樹, 北條賢 クロキンバエにおける食道下領域への多重異種感覚入力と味覚嗅覚情報の収斂統合 第 85 回日本動物学会 2014 年 9 月 宮城

保智己 「第3の眼」 松果体 神経性と液性の2つの出力経路を持つ感覚器官 第 14 回光量子科学研究シンポジウム 2013 年 11 月 京都

山下(川野)絵美, 小柳光正, 和田清二, 保智己, 寺北明久 円口類ヤツメウナギの眼外光受容に関わるオプシンの解析 第 84 回日本動物学会 2013 年 9 月 岡山

平岡けいこ, 大杉知裕, 筒井和義, 保智己 ヤツメウナギにおける室傍器官-下垂体系は存在するのか? 第 84 回日本動物学会 2013 年 9 月 岡山

高橋奈津子, 保智己 深海性魚類ザラビクニン網膜における視覚情報の収斂機構

第 84 回日本動物学会 2013 年 9 月 岡山  
和田清二, 山下(川野)絵美, 保智己, 小柳光正, 寺北明久 硬骨魚類松果体の波長識別に関わる光受容タンパク質の探索 第 84 回日本動物学会 2013 年 9 月 岡山

青山雅人, 川田剛士, 伊丹沙織, 保智己, 安田恵子, 佐竹炎 タキキニンがマウス二次卵胞の成長を促進する 第 37 回日本比較内分泌学会 2012 年 11 月 福井

加藤遥, 宮本由賀, 保智己 ヤツメウナギ幼生側眼の機能と網膜形成過程 第 83 回日本動物学会 2012 年 9 月 大阪

西尾紗織, 保智己, 安田恵子 新生仔マウス精巣の成体型ライディッヒ前駆細胞の増殖に対するアンドロゲンの作用時期 第 83 回日本動物学会 2012 年 9 月 大阪

青山雅人, 川田剛士, 伊丹沙織, 保智己, 安田恵子, 佐竹炎 マウスにおいてタキキニンは卵細胞成長を促進する 第 83 回日本動物学会 2012 年 9 月 大阪

〔図書〕(計 1 件)

保智己 ヤツメウナギ 共立出版 日本生理生化学会(編)「研究者が教える動物飼育 第3巻」 51-54 (2012)

〔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・自然科学系・教授  
研究者番号: 60188448