

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 4 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570069

研究課題名(和文)新規体内時計と環境因子によるクサフグの半月周性産卵リズムの形成機構

研究課題名(英文)Molecular mechanisms of semilunar-synchronized spawning rhythm in the grass puffer: Regulation by a novel biological clock and environmental factors

研究代表者

安東 宏徳 (ANDO, HIRONORI)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：60221743

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：クサフグの15時間周期の新規体内時計の分子機構と発生過程におけるMeIR遺伝子の発現リズムについて解析した。間脳で15時間周期の発現変動を示す遺伝子を網羅的に検索した結果、約220個の遺伝子が同定された。また、MeIRプロモーター-EGFP DNAを受精卵に微量注射して発現を調べた結果、胚の体側部でEGFPが検出されたが、脳では検出されなかった。今後、解析個体を増やすなど検討を行う。さらに、間脳において、クリプトクローム、Kiss、GnIHの遺伝子発現が日周、概日及び月周変動することが明らかになった。孵化後3-4日の仔魚において、MeIR遺伝子の発現量は日周変動をすることが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：To elucidate molecular mechanisms of a novel clock that produces ultradian rhythm in the MeIR gene expression in the brain of grass puffer, a transcriptome analysis was conducted by RNA sequencing to search genes that exhibit ultradian oscillations in expression. In the diencephalon, more than 200 genes were identified as potential ultradian expression genes including genes involved in neural and signal transduction activities. A MeIR promoter-EGFP DNA was constructed to be microinjected into single-cell stage of embryos. EGFP expression was detected in some cells in the lateral region along the body at 2-3 dpf, but not in the brain. Further studies will be needed to examine the promoter region responsible for the ultradian gene expression. In 3-4 dph larvae, MeIR gene showed daily variations in expression under light/dark condition. In addition, cryptochrome, a circadian clock gene, showed daily, circadian and lunar-synchronized expressions in the diencephalon.

研究分野：生殖内分泌学、神経内分泌学

 キーワード：脳・神経 生殖リズム クリプトクローム メラトニン受容体 神経ホルモン 松果体 視床下部 月
 周リズム

1. 研究開始当初の背景

動物はさまざまな生殖リズムを持ち、生息環境条件に適応しながら種を存続している。生殖機能を調節する中枢は、視床下部 - 下垂体系を中心とした神経内分泌系であるが、感覚系から入力された環境情報がどのようなしくみで生殖中枢を制御するのか、よく分かっていない。また、生殖リズムの形成には、松果体に存在する体内時計と松果体ホルモンであるメラトニンが重要な役割をもつと考えられるが、両者の機能的相互作用や時間と日長の情報が生殖中枢の機能を調節する分子機構は不明である。

本研究では、生殖リズムの形成機構を解明するための研究モデルとして、半月周性の産卵リズムをもつクサフグを用いる。クサフグは、春から夏の繁殖期に2週間に1回、大潮の日の満潮前に海岸の一角に集合して産卵する。本研究開始までに、熊本県富岡、福岡県志賀島及び新潟県佐渡市相川をフィールドとして、クサフグの産卵行動調査を行うと共に、水槽内行動実験、視床下部 - 下垂体系の神経ホルモンとその受容体の遺伝子の発現解析、メラトニン分泌の解析、メラトニン受容体 (MelR) 遺伝子の発現解析を行い、主な成果として、次の知見が得られた。

【内因性の行動リズムに関する知見】水槽の底面に石で斜面を作り、水位一定/自然光の条件で行動を観察した結果、魚は大潮の日の満潮前になると斜面に集合した。さらに水位一定/恒暗条件下でも同様のリズムを示し、クサフグが内因性の半月周性の行動リズムをもつことが示唆された。

【視床下部 - 下垂体系に関する知見】生殖機能を制御する神経ホルモン (GnRH, キスペプチン, LPXRFa, PQRFa, バソトシン) 及びその受容体の遺伝子発現量は、産卵期に著しく高まった。また、視床下部においてキスペプチンとLPXRFa及びそれらの受容体の遺伝子発現は明瞭な日周及び概日変動を示し、生殖中枢が概日時計とメラトニンにより調節されることが示唆された。

【メラトニンに関する知見】メラトニン分泌量は、暗期に高まり明期に著しく低下した。また、MelR 遺伝子の発現は、間脳で24時間周期の日周及び概日変動を示した。一方、松果体では恒暗条件下で15時間周期のウルトラディアン変動を示した。

【行動リズムの地域差に関する知見】富岡及び志賀島では明瞭な半月周性の産卵リズムが見られたが、佐渡では大潮に関係なく夕方的一定時刻に産卵した。佐渡では干満の潮位差がほとんどなく、体内時計と潮位の同調作用が弱いと考えられる。

2. 研究の目的

これらの結果より、半月周性産卵リズムの形成機構の解明に向けて、松果体で見出された15時間周期の新規体内時計の分子機構と

その可塑性の解明に焦点をあてて、MelR 遺伝子の周期的転写調節機構という点から新規体内時計の分子の実体と機能に迫ることにした。

具体的には、トランスジェニッククサフグを用いた MelR 遺伝子の転写調節機構の解析、月周産卵リズムへの関与が示唆されている概日時計遺伝子であるクリプトクローム (CRY) の周期的発現の解析と生殖調節神経ホルモンとその受容体遺伝子の月周変動の解析、RNA シークエンス法による15時間周期で発現変動する遺伝子の網羅的同定を行った。また、クサフグの発生過程でのリズム形成過程を明らかにするため、クサフグ仔魚における MelR 遺伝子の発現を解析した。

3. 研究の方法

(1) トランスジェニッククサフグを用いた MelR 遺伝子の転写調節機構の解析

クサフグの Mel1b 遺伝子のプロモーター領域を5'RACE法によって決定した。5'上流域6.1 kbpをPCR法で増幅し、EGFPベクターに挿入した。ベクターとして、メダカDNA型トランスポゾンである Tol2 を発現させるベクターを使用した。産卵期にクサフグを採集し、受精卵に Mel1b-EGFP DNA コンストラクトをマイクロインジェクションした。胚、仔魚、若魚におけるEGFPの発現を蛍光顕微鏡で観察した。また、若魚5匹のDNAを抽出して、EGFPをターゲットにしたPCRによるジェノタイピングを行った。

(2) CRY の周期的発現の解析と生殖調節神経ホルモン遺伝子の月周変動の解析

トラフグゲノムデータベースから4種類のCRY/フォトリアーゼ (PHR) 遺伝子を *in silico* クローニングし、分子系統解析をした結果、それらはCRY1、CRY2、CRY3、PHRのクレードに属することがわかった。それらの塩基配列を基にして、対応する4種類のCRYサブタイプcDNAをクサフグ間脳からクローニングした。得られた部分遺伝子配列を基にして、各サブタイプ遺伝子に特異的なプライマーセットを設計し、RT-PCR法およびリアルタイムPCR法によって、各遺伝子の発現解析を行った。

クサフグ成魚から、終脳、間脳、松果体、視蓋、小脳、延髄、網膜、下垂体、鰓、腎臓、脾臓、肝臓、筋肉、卵巣を採取して、各組織におけるCRY遺伝子の発現をRT-PCR法によって解析した。

次に、CRY遺伝子の間脳における日周、概日、月周発現変動をリアルタイムPCR法によって解析した。産卵期にクサフグ成魚を採集し、自然日長下で1週間水槽で飼育した。日周発現変動の解析では、3時間ごとに8回、間脳をサンプリングした。概日発現変動の解析では、恒暗条件下で3日間飼育した後、その条件下で間脳を3時間ごとに8回サンプリングした。また、月周発現変動の解析では、

クサフグを自然日長下で1週間馴致後、明期の開始から9時間後(ZT9)および18時間後(ZT18)のタイミングで、それぞれ4-5日間隔で7回、間脳をサンプリングした。

また、月周発現変動解析用の間脳試料を用いて、キスペプチンとLPXRfA及びそれらの受容体遺伝子の発現をリアルタイムPCR法によって解析した。

(3)15時間周期で発現変動する遺伝子の網羅的同定

産卵期にクサフグ成魚を採集し、自然日長下で馴致した。魚を恒暗条件に移して2-3日間飼育した後、6時間おきに3回(CT18、CT0、CT6)、松果体と間脳をサンプリングした。RNAシーケンス解析に先立ち、これらの試料中のMel1b遺伝子がウルトラディアン発現変動を示すことを確認するため、リアルタイムPCR法を用いて発現量を解析した。

松果体からは解析に十分な量のRNA試料が得られなかったため、間脳RNA試料を解析に用いた。作製した3つのcDNAライブラリー(CT18、CT0、CT6)を次世代シーケンサー(454 GS Junior、Roche)を用いて解析した。得られた配列データを、トラフグcDNAライブラリーに対してマッピングし、マッピングされなかった配列はコンティグを作り、アノテーションを行った。100万リード当たりのリード数に標準化した値を各遺伝子の発現量とし、3試料間の比較を行った。

(4)クサフグ仔魚におけるMelR遺伝子の発現解析

産卵場でクサフグを採集し、人工授精して胚を自然日長下で飼育した。孵化後2日目に自然日長あるいは恒暗条件に移して、1日後に3時間おきに9回(ZTあるいはCT3、6、9、12、15、18、21、0、3)、仔魚をサンプリングした。仔魚の全脳中のMelR遺伝子の発現量をリアルタイムPCR法によって解析した。

4. 研究成果

(1)トランスジェニッククサフグを用いたMelR遺伝子の転写調節機構の解析

クサフグ受精卵にMel1b-EGFP DNAコンストラクトをマイクロインジェクションして、胚における発現を解析した結果、受精後2-3日の胚の体側部の細胞でEGFPが検出されたが、脳では検出されなかった。また、孵化後1日の仔魚においてもEGFPは検出されなかった。7か月齢の若魚5個体のジェノタイプングを行った結果、2個体がトランスジェニック個体であった。これらの個体の脳内でEGFPの発現は検出されなかった。今後、解析個体の数を増やす、レポーター遺伝子をより高感度のものにする、Mel1b遺伝子の5'上流域を広げるなどの検討を行い、MelR遺伝子の周期的転写を調節する分子機構の解明を目指す。

(2)CRYの周期的発現の解析と生殖調節神経ホルモン遺伝子の月周変動の解析

クサフグ成魚において、CRY1、CRY2、CRY3遺伝子は共に、脳内では終脳、間脳、松果体、視蓋、小脳、延髄に発現しており、末梢組織では、網膜、下垂体、鰓、腎臓、脾臓、肝臓、筋肉、卵巣で発現していた。網膜ではCRY1、CRY3、PHR遺伝子は、予想される長さより長い転写産物が検出された。網膜のCRY1遺伝子転写産物の塩基配列を解析した結果、CRY1遺伝子は全体に渡ってスプライシングされないことがわかった。CRY遺伝子の第1イントロンの始めには終始コドンが存在するため、網膜ではN末端領域だけからなる機能を持たないCRYが作られることが示唆された。

間脳における発現変動を解析した結果、CRY1遺伝子は、明期にピークを持つ日周発現変動と主観的明期の開始時にピークを持つ概日発現変動を示した。また、CRY3遺伝子は有意ではないが、CRY1遺伝子と同様な変動パターンを示した。月周変動については、CRY1遺伝子は、明期(ZT9)では変動は見られなかったが、暗期(ZT18)において月齢15.1にピークを持つ月周発現変動を示した。CRY3遺伝子もCRY1遺伝子と同様な月周発現変動を示した。これらの結果から、CRYはクサフグにおいて概日時計の構成分子として機能すると共に、その発現量が月齢に伴って変化することにより、概日時計の振動パターンが月齢に同調して変化する可能性が示された。すなわち、クサフグの概日時計は概月時計としての機能を併せ持つ可能性がある。

視床下部の生殖調節神経ホルモン遺伝子の発現は、概日時計とメラトニンによって調節されると考えられる。CRY遺伝子の発現が明瞭な月周変動を示したことから、生殖調節神経ホルモンの遺伝子発現も月周変動する可能性がある。そこで、CRYを解析した間脳試料を用いて、キスペプチンとLPXRfA及びそれらの受容体遺伝子の発現を調べた。その結果、キスペプチンとその受容体遺伝子の発現は、1ヶ月の間に1つのピークをもつ月周変動を示し、LPXRfAとその受容体遺伝子の発現は、1ヶ月の間に2つのピークをもつ月周変動を示した。

(3)15時間周期で発現変動する遺伝子の網羅的同定

MelR遺伝子は、間脳において松果体と同様のウルトラディアン発現変動を示したため、十分量のRNA試料が得られた間脳のRNAシーケンス解析を行った。間脳における発現遺伝子は21,702個と推定され、そのうち、3試料のリード数の比較が可能な遺伝子として2425個を選定した。これらの遺伝子の過半数は6時間ごとの発現変動は見られなかったが、ウルトラディアン発現遺伝子とする候補

遺伝子として、低 (CT18) → 高 (CT0) → 低 (CT6) パターンの遺伝子が 89 個、高 → 低 → 高パターンの遺伝子が 132 個、同定された。これらの中には、神経機能における主要な情報伝達系や転写・翻訳調節に関わる遺伝子が多数含まれていた。また、RNA シークエンスの結果の信頼性を確認するため、ウルトラディアン発現候補遺伝子から 8 個の遺伝子を選び、上記の 3 つの間脳試料中の発現量をリアルタイム PCR 法により解析した結果、4 個の低 → 高 → 低パターン遺伝子は、RNA シークエンスと同様の結果が得られたが、4 個の高 → 低 → 高のパターン遺伝子は異なる変動パターンが得られた。今後、ウルトラディアン発現候補遺伝子の周期的発現について詳細に検討すると共に、それらと 15 時間周期の新規体内時計との関係を明らかにしていく。

(4) クサフグ仔魚における MelR 遺伝子の発現解析

孵化後 3-4 日の仔魚において、MelR 遺伝子の発現量は、それぞれ明期及び主観的明期に 1 つのピークをもつ日周及び概日変動を示した。

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 45 件)

Shahjahan, M., Doi, H., Ando, H. (2016) LPXRFamide peptide stimulates growth hormone and prolactin gene expression during the spawning period in the grass puffer, a semi-lunar synchronized spawner. **Gen. Comp. Endocrinol.** 227: 77-83. 査読有

安東宏徳 (2015) クサフグの半月周性産卵回遊行動とホルモン. **海洋と生物** 37: 569-575. 査読無

Takana, M., Yu, R., Kurokawa, D. (2015) Anterior migration of lateral plate mesodermal cells during embryogenesis of the pufferfish *Takifugu niphobles*. **J. Anat.** 227: 81-88. 査読有

服部淳彦 (2015) 概日リズムとアンチエイジング. **Prog. Med.** 35: 943-948. 査読有

Suzuki, N., Somei, M., Hattori, A. et al. (2015) Novel tryptophan derivatives as potentially effective therapeutic drugs to treat bone diseases. **Am. J. Life Sci.**, 3: 31-38. 査読有

Shahjahan, M., Doi, H., Ando, H. (2015) Differential expression patterns of PQRamide peptide and its two receptor genes in the brain and pituitary of grass puffer during the reproductive cycle. **Gen. Comp. Endocrinol.** 210: 152-160. 査読有

Ikegami, T., Maruyama, Y., Doi, H., Hattori, A., Ando, H. (2015) Ultradian oscillation in expression of four melatonin receptor subtype

genes in the pineal gland of the grass puffer, a semilunar-synchronized spawner, under constant darkness. **Front. Neurosci.** 9: 9. 査読有

Ando, H., Ogawa, S., Shahjahan, M., Ikegami, T., Doi, H., Hattori, A., Parhar, I. (2014) Diurnal and circadian oscillations in expression of kisspeptin, kisspeptin receptor and gonadotrophin-releasing hormone 2 genes in the grass puffer, a semilunar-synchronized spawner. **J. Neuroendocrinol.** 26: 459-467. 査読有

Kurokawa, D., Ohmura, T., Aizawa S. et al. (2014) Otx2 expression in anterior neuroectoderm and forebrain/midbrain is directed by more than six enhancers. **Dev. Biol.** 387: 203-213. 査読有

Ando, H., Shahjahan, Md., Hattori, A. (2013) Molecular neuroendocrine basis of lunar-related spawning in grass puffer. **Gen. Comp. Endocrinol.** 181: 211-214. 査読有

[学会発表](計 96 件)

安東宏徳、クサフグの月周同調産卵回遊行動とホルモン、平成 27 年度日本水産学会春季大会シンポジウム「魚類行動生理学の基礎と水産研究への応用」、2015 年 3 月 27 日、東京

服部淳彦、メラトニンとアゴニスト - 今後の展望、第 14 回日本抗加齢医学会総会、2014 年 6 月 7 日、大阪

黒川大輔、他 4 名、非モデル真骨魚類へのゲノム編集技術の応用、第 4 回ゲノム編集研究会、2014 年 10 月 6 日、広島

Hironori Ando, Atsuhiko Hattori, 他 4 名、Neuroendocrine control of semilunar-synchronized spawning migration in grass puffer, 17th International Congress of Comparative Endocrinology, 2013 年 7 月 19 日、バルセロナ

Hironori Ando, 他 3 名、Synchronized diurnal and circadian expressions of kisspeptin and GPR54 genes in the diencephalon of a puffer fish with lunar-related spawning cycles, 2nd World Conference on Kisspeptin Signaling in the Brain, 2012 年 11 月 8 日

[図書](計 3 件)

安東宏徳、光と脊椎動物の生活史、光と生命の事典(日本光生物学協会編集) 朝倉書店、2016、106-107

Hironori Ando, Handbook of Hormones-Comparative Endocrinology for Basic and Clinical Research (Ed. by Y. Takei, H. Ando, K. Tsutsui), Elsevier Inc., 2015, 646 (31-38, 99-107, 291)

Ando, H., Ikegami, T., Maruyama, Y., Shahjahan, Md. and Hattori, A., Sexual Plasticity and Gametogenesis in Fishes (Ed. by B. Senthilkumaran), Nova Science Publishers Inc.,

2013, 470 (17-29)

〔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) 研究代表者

安東 宏徳 (ANDO Hironori)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：60221743

(2) 研究分担者

服部 淳彦 (HATTORI Atsuhiko)

東京医科歯科大学・教養部・教授

研究者番号：70183910

黒川 大輔 (KUROKAWA Daisuke)

東京大学・理学(系)研究科(研究院)・

助教

研究者番号：40342779

(3) 連携研究者

野崎 真澄 (NOZAKI Masumi)

新潟大学・自然科学系・教授

研究者番号：70136232

安房田 智司 (AWATA Satoshi)

新潟大学・自然科学系・助教

研究者番号：60569002

(4) 研究協力者

土井 啓行 (DOI Hiroyuki)