

平成 30 年 6 月 23 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18753

研究課題名(和文) 熱帯性魚類の月齢同調産卵を制御する脳内ネットワークの探索

研究課題名(英文) Molecular machinery of lunar-synchronous spawning in the brain of a tropical fish

研究代表者

竹内 悠記 (TAKEUCHI, Yuki)

琉球大学・理工学研究科・博士研究員

研究者番号：00754904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：熱帯から温帯域に広く分布するアイゴ科魚類は、繁殖期の間、種ごとに特定の月齢で一斉に産卵する月齢同調産卵を行う。本研究ではゴマアイゴの脳内で発現する時計遺伝子を網羅的に同定し、月の満ち欠けに応じた月光の周期的な変化が時計遺伝子発現におよぼす影響について精査した。その結果、月光に即時的に反応する時計遺伝子と、月光刺激により1周期のみ月周変動する時計遺伝子の存在が明らかとなった。本結果からゴマアイゴは月光刺激によって約1ヶ月の時間を計測可能な砂時計型のタイマーを利用して産卵月齢を認知することが考えられた。

研究成果の概要(英文)：Goldlined spinefoot, *Siganus guttatus*, inhabits tropical and subtropical waters. This fish exhibit lunar-synchronous spawning which is observed around the first quarter moon. In this study, we identified three *Cry*, two *Per*, two *Clock*, and two *Bmal* genes in *S. guttatus* and investigated the impact of moonlight on their expression in the diencephalon. Interruptions of moonlight for 1 lunar cycle beginning at the new moon significantly modified *Cry3* expression levels in the diencephalon. Additionally, acute interruptions of moonlight around the waxing gibbous moon upregulated nocturnal expressions of *Cry1b* in the diencephalon. These results suggest that clock genes respond to moonlight likely contribute to lunar phase recognition by organizing an hourglass-like lunar timer system.

研究分野：魚類生理学

キーワード：月齢同調産卵 ゴマアイゴ 時計遺伝子 Cryptochrome 月周期性

### 1. 研究開始当初の背景

ハタ科魚類やアイゴ科魚類は熱帯から温帯まで南北に広く分布しており、それぞれの生息域の環境に適応した繁殖活動を行っている。この結果、同種であっても棲息地域によって異なる繁殖期を持つ。その一方で、こうした魚類の産卵周期には地理的な差が無く、種ごとに、ある特定の月齢において月1回の産卵を同調的に行う。こうした現象は月齢同調産卵と呼ばれ、月の満ち欠けによって生じる「月光の照射時間と光強度の周期的変化(図1)」が一斉産卵を制御する環境要因と考えられる。

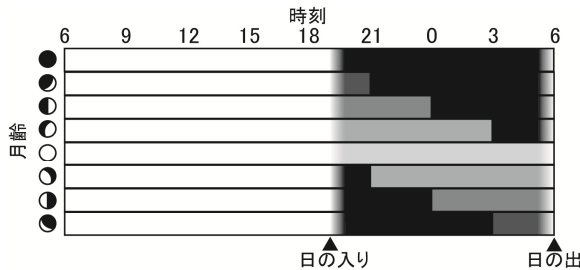


図1. 月齢に応じた月光照射時間と光強度の変化  
一般的に、外界の光周期情報は体内時計の構成因子である時計遺伝子の発現振動といった内的周期情報に変換され、様々な生理現象を制御することが知られている。沖縄島周辺に生息するゴマアイゴは初夏の産卵期において上弦の月に同調した月齢同調産卵を行うことが知られており、Cryptochrome(*cry*)遺伝子の一部は月齢依存的な発現変動を示すことが明らかとなっている。しかしながら、月の満ち欠けに応じた月光の周期的な変化という長周期かつ微弱な光強度の変化が時計遺伝子を介した体内での周期性発振に関与するかは不明な点が多い。

### 2. 研究の目的

本研究では、月齢同調産卵魚の一つであるゴマアイゴを研究対象とし、本種の時計遺伝子発現に月光がおよぼす影響を詳細に調べることで、微弱な夜間光の周期的な変化を基に産卵月齢を認知する分子機構の解明を目的とした。

### 3. 研究の方法

沖縄島周辺のゴマアイゴの産卵期である6月から7月にかけて自然光周期下で飼育したゴマアイゴの脳内より Total RNA を抽出し、RNA-seq に供することで、脳内に発現する時計遺伝子の網羅的な同定を試みた。その後、細分化した脳部位における時計遺伝子発現の月光応答性と概月振動性について検討するとともに、月光の光波長スペクトルを模した人工月光ライトの照射が時計遺伝子発現に与える即時的な影響を調べた。その後、ゴマアイゴの全ゲノムシーケンスを行い、月齢依存性を示す時計遺伝子の cis-element を調べることで、月齢依存的な時計遺伝子発現の駆動メカニズムを調べた。

### 4. 研究成果

ゴマアイゴの脳内に発現する時計遺伝子の網羅的な同定を RNA-seq により試みた結果、過去に同定済みの時計遺伝子を含めて、5種の *cry* 遺伝子、4種の *Period(per)* 遺伝子、2種の *Bmal* および2種の *Clock* 遺伝子の同定に成功した。これらの時計遺伝子発現の月光応答性と概月振動性について検討した。その結果、ゴマアイゴの間脳に発現する *cry3* は月光情報の存在下においては新月周辺で発現が上昇し、満月周辺で発現が減少する1カ月周期の変動を示す一方、1ヶ月以上月光照

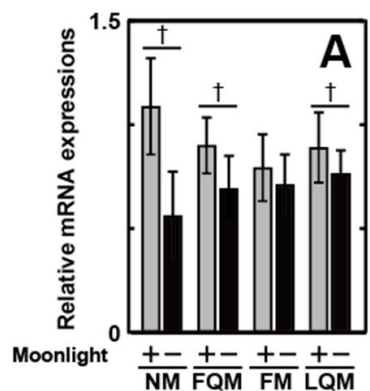


図2. 間脳における *cry3* の月齢依存的な発現変動。 *cry3* は自然条件下において月齢に応じた1カ月周期の発現変動を示す一方、継続的な月光遮断条件下においては変動が消失する。

射を遮断した条件下においては、その月齢依存的な変動が消失することが観察された(図2)。また、間脳域に発現する *cry1b* は月光照射に対して即時的に应答し、発現量が減少することが明らかとなった(図3)。

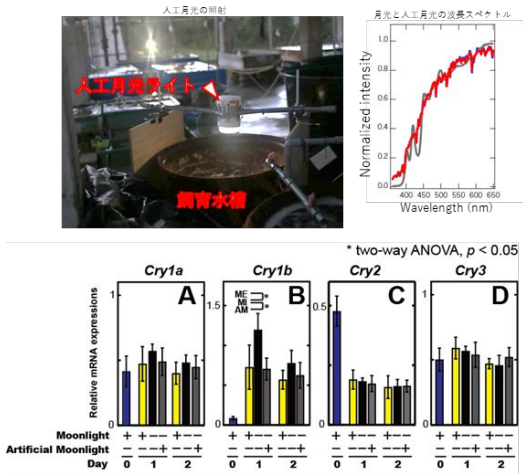


図3. 人工月光照射による時計遺伝子の月光即時应答性の検討。間脳における *cry1b* 発現は顕著な月光即時应答性を示す。

これらの結果から、月光に即時的に应答する時計遺伝子発現が月光情報の入力を担い、*cry3* を状態変数とする砂時計型のタイマー機構がゴマアイゴの月齢認知を可能にするモデルが提唱された(図4)。

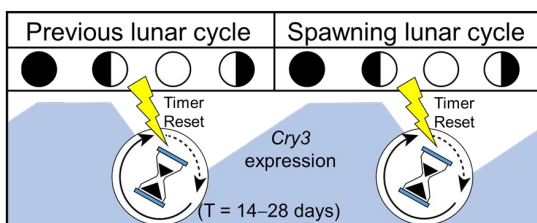


図4. 砂時計型タイマーを用いた産卵月齢認知モデル。砂時計型タイマーは新月から満月の月光刺激でリセットされ、*cry3* 発現量は体内で月齢情報を示す状態変数として機能する。

これらに加え、*cry2*, *per2a*, *clock1a* および *clock1b* といったいくつかの時計遺伝子においては、その日周発現パターンに継続的な月光遮断が影響を与えることが明らかとなった。これらの結果から、周期的な変化を伴う月光照射が時計遺伝子の安定的な日周変動に必要であることが考えられた。夜間の微弱な光照射が概日時計の発振機構に与える影響はあまり理解が進んでいないことから、本結果は今後重要なテーマになると考えられる。

さらに、砂時計型のタイマー機構の構成に重要と考えられた時計遺伝子の転写制御機構について調べるため、Illumina HiSeq によるショートリードシーケンスと Oxford Nanopore MinION によるロングリードシーケンスを組み合わせた Hybrid assemble によるゴマアイゴの全ゲノム配列の解読を試みた結果、5313本の scaffold から成る約 635Mbp の全ゲノムアセンブリー (N50 = 537728) を構築することができた。時計関連遺伝子のうち特に月齢同調産卵に重要と考えられる *cry3* の転写制御領域には RORE に相同な配列に加え、E-Box に相同な配列も確認できることから、*cry3* 転写の制御には複数の時計関連遺伝子によって刻まれる時刻情報が統合されている可能性があった。

## 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 1件)

1. Takeuchi, Y., Kabutomori, R., Yamauchi, C., Miyagi, H., Takemura, A., Okano, K., Okano, T. (2018) Moonlight controls lunar-phase-dependency and regular oscillation of clock gene expressions in a lunar-synchronized spawner fish, Goldlined spinefoot. Scientific Reports 8: 6208 (査読あり)

[学会発表](計 4件)

1. 岡野俊行, 竹内悠紀, 兜森 椋, 山内千裕, 宮城ひとみ, 竹村明洋, 岡野 恵子 (2017) 月齢同調性産卵を示すゴマアイゴにおける時計遺伝子の月光应答および砂時計型月齢タイマー機構. 日本分子生物学会 2017 年度生命科学系学会合同年次大会 (神戸ポートアイランド、兵庫県・神戸市)

2. Mahardini, A., Miyagi, H., Nakatani, S., Takeuchi, Y., Ayson, FG., Jesus-Ayson, E., Takemura, A. (2016) The Joint meeting of 22nd International Congress of Zoology & the 87th meeting of the Zoological Society of Japan (Ginowan convention center, Okinawa, Japan)

3. Kabutomori, R., Takeuchi, Y., Yamauchi, C., Miyagi, H., Takemura, A., Okano, K., Okano, T. (2016) The impact of moonlight on clock gene expression in a lunar-synchronized spawner fish, the golden spinefoot. The Joint meeting of 22nd International Congress of Zoology & the 87th meeting of the Zoological Society of Japan (Ginowan convention center, Okinawa, Japan)

4. Takeuchi, Y., Takemura, A., Okano, T. (2016) Lunar-phase-dependent synchronous spawning and lunar clock in the goldlined spinefoot, *Siganus guttatus*. 22nd International Congress of Zoology, International symposium-2, Enigmatic Clocks: Non-Circadian Biological Rhythms (OIST, Okinawa, Japan)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

竹内悠記(TAKEUCHI, Yuki)

琉球大学大学院・理工学研究科・博士研究員

研究者番号 : 00754904

### (2)研究分担者

なし

### (3)連携研究者

岡野俊行(OKANO, Toshiyuki)

早稲田大学・理工学術院・教授

研究者番号 : 40272471

竹村明洋(TAKEMURA, Akihiro)

琉球大学・理学部・教授

研究者番号 : 40222103

### (4)研究協力者

なし