

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2005～2009

課題番号：17108003

研究課題名(和文)

脊椎動物における光周性の分子機構解明

研究課題名(英文)

Molecular Mechanisms of Vertebrate Photoperiodism

研究代表者：

海老原 史樹文 (Ebihara Shizufumi)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：50135331

研究成果の概要(和文)：

植物の開花や動物の繁殖活動など、日長に伴う生命現象の変化は光周性反応として古くから知られている。しかし、脊椎動物における光周性の分子基盤は不明であった。本研究は、哺乳類、鳥類及び魚類を用いて、光周性制御遺伝子 *Dio2* に関する研究を中心として、光入力から GnRH 放出に到る一連のプロセスを明らかにすることを目的とした。

研究成果の概要(英文)：

The photoperiodic control of physiological phenomena (known as photoperiodism), such as flowering in plants and reproductive activity in animals is observed in a wide variety of species. However, the molecular mechanism of photoperiodism was not well understood in any organism studies. In the present study, we investigated a process from photic inputs to GnRH release in photoperiodism, focusing on the regulation and function of *Dio2* gene using fish, birds and mammals.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2005年度	22,000,000	6,600,000	28,600,000
2006年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
2007年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
2008年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
2009年度	16,000,000	4,800,000	20,800,000
総計	86,000,000	25,800,000	111,800,000

研究分野：生物系

科研費の分科・細目：農学、畜産・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：生理、行動、生産機能制御

## 1. 研究開始当初の背景

我々はウズラの光周性を制御する遺伝子 (*Dio2*) を特定することに成功した (*Nature*, 2003)。光周性反応における日長の伝達は、哺乳類では松果体で合成されるメラトニンの分泌リズムにより、一方鳥類では脳内光受容器を介して直接視床下部に伝えられる。鳥類では光により *Dio2* の発現が誘導され、哺乳類ではメラトニンが視床下部における *Dio2* の発現を調節する

(*Endocrinology*, 2004)。すなわち、日長の伝達様式は違っても *Dio2* が脊椎動物の光周性制御に中心的役割を果たすことには変わりはない。そこで本研究では *Dio2* を中心として、光周性の分子機構を魚類、鳥類、哺乳類を用いて解明しようと試みた。

## 2. 研究の目的

光周期の受容から性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 放出に到る一連のプロセ

スを明らかにすることを目的として、以下の項目についての実験を行った。

(1) 光周期処理機構の解明、(2) 甲状腺ホルモン依存性機構の解明、(3) 甲状腺ホルモン非依存性機構の解明、(4) GnRH 放出機構の解明、(5) 光周性関連遺伝子の網羅的解析、(6) 光周性生理機能の多面的展開

### 3. 研究の方法

(1) 光周期処理機構を解明するために、マウス時計遺伝子 *mPer1* のプロモーターの下流にホタルのルシフェラーゼをレポーター遺伝子として導入したトランスジェニックマウスなどを利用して調べた。そのために、発光イメージングシステムを購入した。また、光周性に関与する脳内光受容体の同定するために、生理学的、分子生物学的、組織学的手法を用いて検討した。(2) 甲状腺ホルモン依存性、(3) 非依存性機構、また (4) GnRH 放出機構の解明を解明するために、分子生物学的手法、組織学的手法、生理学的手法を用いて検討した。(5) 光周性関連遺伝子の網羅的解析をするために、DNA チップを用いた解析を行った。(6) リズム異常のマウスについて遺伝学的手法を用いて解析した。

### 4. 研究成果

光周性反応の制御機構を解明するには、日長の読み取りから GnRH 放出に到る一連のプロセスを理解することが重要である。従って、それらのプロセスについて検討した。

#### (1) 光周期処理機構の解明

① 日長情報が視交叉上核 (SCN) でどのように処理されているかを時計遺伝子 (*mPer1*) の発現リズムを基に調べた。その結果、SCN の吻側方向半分の領域の発現パターンが日長により変化することを明らかにした (*J Biol Rhythms, 2008*)。

② メダカの脳内に発現するオプシン遺伝子の cDNA クローニングを行い、VAL オプシン cDNA 全長の塩基配列とゲノム構造を解明した。また、メダカを対象として光受容体特異的に発現するメラトニン合成酵素 AANAT の cDNA クローニングを行い、3 種の AANAT cDNA の塩基配列とゲノム構造を解明した。

③ 鳥類では日長情報の受容が脳内光受容器で行われている。しかし、どのような光受容物質が関与しているか不明であった。そこで、ウズラの脳内に発現している光受容物質の候補を調べたところ、オプシン 5 が室傍器官に発現していることを見出した。加えて、オプシン 5 が光受容能を有していることを電気生理学的手法により示し、光周性の制御にオプシン 5 が関与することを

明らかにした (*PNAS, 2010*)。

#### (2) 甲状腺ホルモン依存性機構の解明

① 短日繁殖動物のヤギでは長日繁殖動物とは逆に、長日条件下で *Dio2* の発現が抑制されることを明らかにした (*Endocrinology, 2006*)。また、周年繁殖する Wistar ラットでは日長が変化しても *Dio2* の発現が変わらないのに対して、長日性の Fischer344 ラットでは *Dio2* が長日で高く、短日で低くなることを見出した (*Am J Physiol, 2007*)。長日繁殖動物では *Dio2* の発現が長日で高くなり、不活性型の T<sub>4</sub> が活性型の T<sub>3</sub> になる。一方、3 型脱ヨウ素酵素 (*Dio3*) は T<sub>3</sub> を不活性型の甲状腺ホルモンに変換するが、この遺伝子は *Dio2* とは逆に短日で高く、長日で低くなることをウズラで見出した (*Endocrinology, 2005*)。さらに、甲状腺ホルモンは脂溶性のため拡散により細胞内に取り込まれると考えられてきたが、有機陰イオントランスポーター (*Oapt1c1*) により *Dio2*、*Dio3* が発現する脳室上衣細胞へ能動輸送されることを明らかにした (*Endocrinology, 2006*)。これらの成果は、*Endocrinology* 誌、*News & Views* で紹介された。

② *Dio2* により活性化された甲状腺ホルモン T<sub>3</sub> が GnRH 放出をもたらす機構を明らかにするために正中隆起の微細構造を調べ、T<sub>3</sub> が GnRH 神経終末を取り囲むグリア細胞の形態変化を起こすことを明らかにした (*Cell Tissue Res, 2006*)。

#### (3) 甲状腺ホルモン非依存性機構の解明

① ディファレンシャル解析で光周性の新たな制御因子の探索を行った。その結果、TGF $\alpha$  と insulin receptor (IR) を発見した (*Endocrinology, 2007; Brain Res, 2007*)。

#### (4) GnRH 放出機構の解明

① メタスチンが GnRH および性腺刺激ホルモンの強力な放出因子であり、その作用部位が脳内の特定の領域であることを明らかにした (*Endocrinology, 2005*)。また、メタスチンは性成熟のみならず成熟個体における性周期の維持にも第一義的な働きをするペプチドであることを確かめた (*J Rep Dev, 2007*)。さらに、泌乳期における性腺機能抑制においても生理的に重要な役割を果たしていることを発見した (*Endocrinology, 2007*)。

#### (5) 光周性関連遺伝子の網羅的解析

① ジーンチップを用いた新たな光周性鍵遺伝子を発見した。光周性シグナル伝達経路で MBH での *Dio2* 発現の急激な誘導が鍵となることを既に明らかにしているが、ニワトリのジーンチップを用いて、甲状腺刺激ホルモン (TSH)  $\beta$  サブユニットがその誘導の引き金を引くことを発見した。すなわち、脳深部光受容器で受容した光情報が

下垂体隆起葉で TSH  $\beta$  サブユニットの発現を誘導し、第 3 脳室の脳室上皮細胞の存在する TSH 受容体に結合して *Dio2* の急激な発現をもたらすことを示した。  
(*Nature*, 2008)。

#### (6) 光周性生理機能の多面的展開

①光周性研究の過程で、近交系マウス CS の活動パターンが長日にも関わらず短日型を示すことを見出した。鬱病などの精神疾患はリズム異常を伴うことが知られているため、抗鬱薬のスクリーニング法である尾懸垂テスト、強制水泳テストを行ったところ、極めて異常な値が得られた。そこで、この行動を支配する遺伝子の同定を目標に一連の遺伝学的研究を行ったところ、*Usp46* が原因遺伝子であることが明らかになった (*Nature Genetics*, 2009)。

#### 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 72 件)

- (1) Nakane Y, Ebihara S, Yoshimura T. (7 番目/9 名) A mammalian neural tissue opsin (Opsin 5) is a deep brain photoreceptor in birds. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107(34):15264-8, 2010 査読有
- (2) Tomida S, Mamiya T, Abe K, Yoshimura T, Nabeshima T, Ebihara S. (16 番目/16 名) *Usp46* is a quantitative trait gene regulating mouse immobile behavior in the tail suspension and forced swimming tests. *Nat Genet*. 41:688-695, 2009. 査読有
- (3) Watanabe T, Yoshimura T, Ebihara S. (16 番目/16 名) Genetic and molecular analysis of wild-derived arrhythmic mice. *PLoS ONE*. 4(1):e4301, 2009 査読有
- (4) Yasuo S, Yoshimura T, Ebihara S, Korf HW. Melatonin transmits photoperiodic signals through the MT1 melatonin receptor. *J. Neurosci*. 29:2885-2889, 2009 査読有
- (5) Naito E, Watanabe T, Tei H, Yoshimura T, Ebihara S. Reorganization of the suprachiasmatic nucleus coding for day length. *J. Biol. Rhythms* 23:140-149, 2008 査読有
- (6) Nakao N, Ebihara S, Ueda HR, Yoshimura T. (20 番目/22 名) Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature* 452:317-22, 2008 査読有
- (7) Ono H, Ebihara S, Korf HW, Yoshimura T. (7 番目/9 名) Involvement of thyrotropin in photoperiodic signal transduction in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105(47):18238-42, 2008 査読有
- (8) T. Watanabe, T. Yoshimura, S. Ebihara. (6

番目/6 名) Bimodal clock gene expression in mouse suprachiasmatic nucleus and peripheral tissues under a 7-hour light and 5-hour dark condition.

*J. Biol. Rhythms* 22:58-68, 2007 査読有

(9) T. Watanabe, S. Ebihara, T. Yoshimura. (7 番目/8 名) Hypothalamic expression of thyroid hormone-activating and -inactivating enzyme genes in relation to photorefractoriness in birds and mammals.

*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 292:R568-R572, 2007 査読有

(10) S. Yasuo, S. Ebihara, T. Yoshimura. (8 番目/9 名) Differential response of type 2 deiodinase gene expression to photoperiod between photoperiodic Fischer 344 and nonphotoperiodic Wistar rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 292(3):R1315-9, 2007. 査読有

(11) T. Takagi, S. Ebihara, T. Yoshimura. (8 番目/9 名) Involvement of transforming growth factor  $\alpha$  TGF in the photoperiodic regulation of reproduction in birds. *Endocrinology*. 148(6):2788-2792, 2007 査読有

(12) N. Nakao, S. Ebihara, T. Yoshimura. (10 番目/11 名) Circadian clock gene regulation of steroidogenic acute regulatory protein gene expression in preovulatory ovarian follicles. *Endocrinology* 148:3031-3038, 2007 査読有

(13) T. Anraku, S. Ebihara, T. Yoshimura. (10 番目/11 名) Photoperiodic changes in hypothalamic insulin receptor gene expression are regulated by gonadal testosterone. *Brain Res*. 1163:86-90, 2007 査読有

(14) Yasuo S, Yoshimura T, Ebihara S, Korf HW. Temporal dynamics of type 2 deiodinase expression after melatonin injections in Syrian hamsters. *Endocrinology* 148:4385-92, 2007 査読有

(15) S. Yasuo, S. Ebihara, T. Yoshimura. (15 番目/16 名) Long day suppressed expression of type 2 deiodinase gene in the mediobasal hypothalamus of the Saanen goat, a short day breeder: Implication for seasonal window of thyroid hormone action on reproductive neuroendocrine axis. *Endocrinology* 147:432-440, 2006 査読有

(16) T. Watanabe, T. Yoshimura, S. Ebihara. (9 番目/9 名) Peripheral clock gene expression in CS mice with bimodal locomotor rhythms. *Neurosci Res*. 54:295-301, 2006 査読有

(17) S. Yasuo, S. Ebihara, T. Yoshimura. (7 番

目 /8 名) Molecular mechanism of photoperiodic time measurement in the brain of Japanese quail. *Chronobiology International*, 23:307-315, 2006 査読有 (18) N.Nakao, S.Ebihara, T.Yoshimura. (8 番目/9 名) Possible involvement of organic anion transporting polypeptide 1c1 in the photoperiodic response of gonads in birds. *Endocrinology* 147:1067-1073, 2006 査読有

(19) T.Yamamura, S.Yasuo, K.Hirunagi, S.Ebihara, T.Yoshimura. T3 implantation mimics photoperiodically reduced encasement of nerve terminals by glial processes in the median eminence of Japanese quail. *Cell Tissue Res.* 324:175-179, 2006 査読有

(20) S.Yasuo, S.Ebihara, T.Yoshimura. (6 番目/7 名) The reciprocal switching of two thyroid hormone -activating and -inactivating enzyme genes is involved in the photoperiodic gonadal response of Japanese quail. *Endocrinology* 146:2551-2554, 2005 査読有

(21) T.J.Nakamura, S.Ebihara, K.Shinohara. (6 番目/7 名) Estrogen differentially regulates expressions of *Per1* and *Per2* genes between central and peripheral clocks, and between reproductive and non-reproductive tissues in female rats. *J Neurosci Res* 82:622-630, 2005 査読有

[学会発表] (計 151 件)

(1) 海老原史樹文. マウスの「行動的絶望」を制御する遺伝子の特定、理研筑波セミナー 2009/5/12

(2) 海老原史樹文. “行動的絶望”を司る量的形質遺伝子の特定 -リズム異常を示す CS マウスを用いて-, ワークショップ「生物時計研究の展開」、日本遺伝学会第 80 回大会 2008/9/3-5

(3) 海老原史樹文. “行動的絶望”を司る遺伝子の特定. 川村浩先生アショフ・本間賞受賞記念シンポジウム、2008/4/18、三菱化学生命科学研究所

(4) Ebihara S. Reorganization of the suprachiasmatic nucleus by photic and non-photoc environments. 2<sup>nd</sup> Aschoff-Honma Prize Memorial Symposium. Nov. 6<sup>th</sup>, 2007, Tokyo.

(5) Yoshimura T. MOLECULAR MECHANISMS OF PHOTOPERIODIC TIME MEASUREMENT IN BIRDS, From Molecular clocks To Human Health Symposium 200 7.7.7-10, National Wine Centre of Australia

(6) Ebihara S. Regional patterns of clock gene expression in the mouse SCN under

different environmental conditions. The 22nd International Symposium in Conjunction with Award of the International Prize for Biology “Chronobiology” Dec 1 -2, 2006, Tokyo International Forum

(7) Ebihara S. 24th International Ornithological Congress, Hamburg, Germany, 13-16 August 2006.

(8) Ebihara S. Molecular understanding of vertebrate photoperiodism. International Symposium of Chronomedicine and Biological Clocks. July 9, 2006. Hokkaido University.

(9) Nakao N. Identification and characterization of thyroid hormone transporter mediating photoperiodic response in birds 10th Meeting of Society for Research on Biological Rhythms 2006. 5. 21-25

(10) S. Yasuo. Fine tuning of photoperiodic time information in avian brain. 10<sup>th</sup> Congress of the European Pineal and Biological Rhythms Society. September 1st-5th, 2005 - Frankfurt/Main, Germany

[図書] (計 5 件)

(1) 海老原史樹文・井澤毅共編. *光周性の分子生物学*、シュプリンガー・ジャパン、総ページ数 199、2009 査読無

(2) S.Ebihara, S.Yasuo, T.Yoshimura. Melatonin regulation of clock genes in birds. In *Functional Avian Endocrinology* (A. Dawson & P. J. Sharp eds.) Narosa, New Delhi, pp 215-222, 2005

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: 尾懸垂テスト及び強制水泳テストにおけるマウスの無動化を制御する遺伝子

発明者: 海老原史樹文 富田滋

権利者: 国立大学法人名古屋大学

種類: 特許

番号: 特許出願 2008-104962

出願年月日: 平成 20 年 4 月 14 日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~rhythm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

海老原 史樹文 (EBIHARA SHIZUFUMI)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号: 50135331

(2) 研究分担者

前多 敬一郎 (MAEDA KEIICHIROU)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号：30181580

吉村 崇 (YOSHIMURA TAKASHI)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授  
研究者番号：40291413

飯郷 雅之 (IIGOU MASAYUKI)  
宇都宮大学・農学部・准教授  
研究者番号：10232109

(3) 連携研究者

中尾暢宏 (NAKAO NOBUHIRO)  
名古屋大学・大学院生命農学研究科・研究員  
HW Korf

Johann Wolfgang Goethe-Universität・教授  
安尾しのぶ (YASUO SHINOBU)

Johann Wolfgang Goethe-Universität・研究員