

令和 4 年 6 月 2 日現在

機関番号：18001

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03053

研究課題名(和文) 月周性産卵魚の概月性を司るタイマー型砂時計の実体と概日時計との関連性の解明

研究課題名(英文) Studies on the circadian and circalunar system in the lunar-synchronised spawner

研究代表者

竹村 明洋 (Takemura, Akihiro)

琉球大学・理学部・教授

研究者番号：40222103

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：月周性を示す熱帯性魚類が月から得られる周期的な環境情報を内因性の情報に伝達する機構については不明な点が多い。本研究は、ヤイトハタの主時計の実体の解明を目的として行われた。時計遺伝子(Per2)の発現変化をwhole mount in-situ hybridizationで調べた結果、松果体での発現は受精後90時間から見られ、暗期に減少して明期に増加した。明暗条件下で飼育した幼魚のPer2の発現量は脳下垂体と松果体において昼に高く、夜に低くなった。恒暗条件では脳下垂体や松果体でのPer2の日周変化が消失した。以上の結果からヤイトハタの主時計は松果体にある可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

哺乳類では主時計が視交叉上核にあることはよく知られているが、魚類では主時計が松果体か視交叉上核にあるかについては議論が分かれる。本研究では、月周性産卵を示すハタ科魚類の主時計の存在部位をあきらかにすることができた。この結果は、海産スズキ目の阪における主時計の存在を示した点で時間生物学的な観点でインパクトがある。また、ハタ科魚類の産卵の時刻合わせを光(もしくは月光)で制御することへの道筋を開いたことから、水産学的観点で応用的な価値も持っている。

研究成果の概要(英文)：It is not known how tropical fish with lunar synchrony utilize cues from the moon and transduce them into internal signals. The present study aimed to clarify the location of master clock in the brain of the Malabar grouper, which repeat spawning around the new moon period. Whole mount in-situ hybridization revealed that a day-high and night-low rhythm of Per2 appeared in the pineal gland of 90-h embryos. Under light-dark conditions, expressions of Per2 in the pineal and pituitary glands of immature fish showed daily variation with an increase during daytime. Daily variation of Per2 in the pituitary gland and pineal gland disappeared under constant dark conditions. It is concluded that the master clock of this fish exists in the pineal gland.

研究分野：魚類生理学

キーワード：月周性 時計遺伝子 ヤイトハタ マスタークロック 脳下垂体 松果体

### 1. 研究開始当初の背景

内因性の時計(生物時計)は、生物が外部環境変化を予期しつつ対応し、個の生存と種の繁栄を保障する仕組みである。生物時計のうち、概日時計は約 24 時間の周期で繰り返される睡眠覚醒などに関与し、環境の明暗変化が主たる同調因子となっている。浅海性の生物には、約 24 時間の周期性に加えて、水域の環境変化に合わせた約 12.4 時間周期(潮汐周期)や約 29.4 日周期(月周期)が成長、摂餌、回遊、そして繁殖などに見られる(Takemura et al., 2010)。潮汐周期や月周期は恒常条件下で自律振動する場合があります、生物時計(それぞれ概潮汐時計や概月時計)が時刻合わせに関与していることが考えられている。

哺乳類では概日周期を統合するマスタークロック(主時計)が視床下部の視交叉上核に局在していることはよく知られている。これに対し、魚類では恒常条件下で自律振動する細胞群が脳内の松果体や間脳域などに認められることから、主時計の脳内局在部位については見解が分かっている。さらに、概日時計以外の周期を統合する生物時計の実体や脳内局在部位については全く分かっていない。成長や生殖等を制御する内分泌系が生物時計とどのように関連しつつ活性化されて周期性をうみだしているのかについても不明なままである。

申請者のこれまでの研究から、産卵周期に月周性を示す魚類(アイゴ類やハタ類)の概日時計関連遺伝子は脳内で日周変動することに加えて、その発現量は月光の量的変化を同調因子として月相間で変動することが明らかとなっている。加えて、月光遮断実験などを行うことにより、魚類の月周性の時刻合わせに関わる生物時計は、ある時点から時間を計測するタイマー型の生物時計(タイマー型砂時計)であることを示した(Fukushiro et al., 2011)。これらの結果から、魚類の主時計と概月時計の脳内部位を特定し、それらの関連性を明らかにすることが日周性と月周性にかかわる時刻合わせ機構を一気に解決する手段になり得ると考えた。

熱帯・亜熱帯の浅海域に生息する魚類の多くは月周性産卵周期を持ち、月一回の産卵を種ごとに決まった月相で繰り返す。例えば、アイゴ類のうちのアマアイゴは新月付近で、ゴマアイゴは上弦の月(新月から 7 日目)付近で、そしてハナアイゴは下弦の月(満月から 7 日目)付近で産卵する。産卵周期に月周性を示すこれらの魚類の配偶子形成から産卵にいたる過程は、他魚種と同じく視床下部-脳下垂体-生殖腺(HPG)軸から分泌される様々なホルモンによって制御されているが(Takemura et al., 2010) 彼らに特徴的なことは、月から得られる周期的な環境情報を約一ヵ月周期の内因性の情報に伝達し、特定月相での HPG 軸からのホルモンの分泌の引き金を引いていることである。従って、月相の認識と内部情報への転換は、HPG 軸の近傍の視床下部、もしくはより上位部位において行われていると推測される。

### 2. 研究の目的

本研究では、松果体と間脳域(視交叉上核)に着目し、ハタ科魚類の概日時計を司る主時計の局在と概月性を司るタイマー型砂時計の実体解明を目指すことを目的とする。この目的を達成するために、(1)仔稚魚期から幼魚期の松果体と視交叉上核における概日時計関連遺伝子群の発現パターンを追跡するとともに、(2)ハタ科魚類(ヤイトハタ)における概日性の主時計と月周性に関わるタイマー型砂時計との関連性を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) 実験魚：本研究ではスズキ目ハタ科マハタ属のヤイトハタ(Bloch and Schneider, 1801)を対象に実験を行った。定量 PCR 法および *In situ* hybridization (ISH) 法に用いたヤイトハタ幼魚は、栽培漁業センターから分与を受け、瀬底研究施設で飼育された個体(n=100, 全長  $13.5 \pm 2.6$  cm)であった。自然日長条件下(明期 13 時間、暗期 11 時間)における、昼 12 時と夜 12 時の 2 回にわたってヤイトハタから組織を採取した。抽出した松果体と視床下部域を含む脳領域はそれぞれ定量 PCR 法と ISH 法へと供した。また、明暗条件下(明期 13 時間、暗期 11 時間)での馴致の後に、恒暗条件下へと切り替えた状態においても、同様の組織採取を行った。Whole mount ISH (WISH) 法に用いたヤイトハタ受精卵(約 30 g)は、2019 年 7 月 1 日 20 時 30 分頃に栽培漁業センターで採集され、瀬底研究施設水槽棟屋上ガラス室に設置したクリアバタンク(1ト

ン)へと移送したものであった。孵化後、7月3日から7月8日の8:30、14:30、20:30の各時間において仔稚魚(n=6)を採取し、4%パラホルムアルデヒド/リン酸緩衝生理食塩水(4%PFA/PBS)で固定した。これらは受精後60時間から186時間の個体であった。また、同様の操作を栽培漁業センターにおいても行った。

(2)RNAプローブの作成:ハイブリダイゼーションに用いたDIG標識RNAプローブはヤイトハタの脳由来のcDNAを鋳型としたPCR法によって作成された。PCR反応には鋳型DNAを含む、1% TaKaRa LA Taq(TaKaRa)、10% LAPCR バッファー、2.5 mM MgCl<sub>2</sub>、16% dNTP Mixture、0.2 mM フォワードおよびリバースプライマー(Table 1)を用いた。PCRによって得られたDNA断片を2%アガロースゲルによる電気泳動によって分離させ、ゲル上の目的のバンドを Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System(Promega)を用いて抽出し、Agencourt AMPure XP(Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA)によって精製した。そして、DIG RNA Labeling Kit(T7; Roche, Indianapolis, IN, USA)を用いて精製したDNAから転写反応によってDIG標識RNAプローブを合成した。

(3)ISH: *Per2* 遺伝子のRNAプローブの有用性の検証のため、ヤイトハタの脳の視蓋と小脳が含まれるパラフィン切片に対してISH法を用いた予備実験を行った。2019年11月11日にNAICeで得たヤイトハタ3個体の脳を、RNase Quiet(NACALAI TESQUE, 京都)で処理したピンセットとハサミを用いて採取し、PFA/PBSに浸漬し固定した。固定された組織は常法に従ってエタノール系列での脱水とキシレンでの透徹を行ない、ヒストパラフィン(Leica Biosystems Richmond, Richmond, USA)に包埋した。その後、マイクロトームを用いて5μm厚の連続切片を作成して、脱パラフィン処理を行った。そして10μg/ml プロテアーゼ K(Sigma-Aldrich)溶液中に15分間37°Cで浸漬しプロテアーゼ処理を行った。次に、プレハイブリダイゼーション溶液中(4×SSC、50%ホルムアミド)へと移し、30分間室温で静置した。その後、組織をハイブリダイゼーション溶液(50%ホルムアミド、10%デキストラン硫酸、2×SSC、0.02% SDS、0.01% Salmon sperm DNA、0.2% RNAプローブ)に55°Cで10時間浸漬することでハイブリダイズさせた。SSCによる洗浄の後に、ブロッキング液(Roche)をプレパラートに滴下し室温で1時間静置した。さらに、0.2% Alkaline Phosphatase conjugated anti-DIG antibody Fab fragment(Roche)をブロッキング液に加え、スライドに滴下し、4°Cで一晩静置した。発色反応は発色バッファー(1% 100×NBT + 1% 100×BCIP + 10% 10×AP buffer 5ml + DW 45ml)を用いて行った。

WISH法を用いてヤイトハタ仔魚の発生過程における*Per2* 遺伝子の発現解析を行った。採取したヤイトハタ仔魚を24ウェルプレート(COSMO, Tokyo)内で再水和処理を行った。10μg/ml プロテアーゼ K溶液中に30分間室温で浸漬し、続いて、ハイブリダイゼーションバッファー(以下HBとする。50%ホルムアミド、5×SSC、0.1% Tween20、pH=6.0)にサンプルを入れ、ハイブリダイゼーションオープン(EYELA, Tokyo)で55°C、4時間静置した。ハイブリダイズには、HB中に0.1% Salmon sperm DNAと、0.2% RNAプローブを加えた溶液を用いて、振盪しながら55°Cで一晩反応させた。そして、SSC-Tweenによる洗浄の後に、ブロッキング液に浸漬し1時間静置した。Alkaline Phosphatase conjugated anti-DIG antibody Fab fragmentをブロッキング溶液で500倍希釈し、サンプルを浸漬して2時間室温で静置した。発色反応にはNBT/BCIPとAlkaline Tris Buffer(1M Tris HCl、1M MgCl<sub>2</sub>、5M NaCl、20% Tween20)を用いた。PBS-Tweenによる洗浄後、100%グリセロールに振盪しながら一晩おいて透徹処理を行った。サンプル像の撮影には実体顕微鏡(OLYMPUS, Tokyo)および、倒立型蛍光顕微鏡(BZ-X700, KEYENCE, 大阪、日本)を用いた。

(4)定量リアルタイムPCR法(qPCR法):ヤイトハタ松果体における*Per2* 遺伝子の昼夜変動を明らかにするためqPCR法を用いた遺伝子発現解析を行った。摘出された松果体(10個体分)から全RNAを抽出し、逆転写反応により1本鎖cDNAを合成した。qPCRにはSYBR® Premix Ex Taq(TaKaRa)を使用し、CFX96リアルタイムPCRシステム(Bio-Rad Laboratories, CA, USA)を用いて行った。*mgPer2* 遺伝子の発現定量に用いたプライマーはクローニングによって得られた塩基配列を元に設計した。cDNAの希釈系列を用いて検量線を作成し、適切な増幅効率と、高い特異性を示す測定系を構築した。qPCRのプログラムは95°C30秒で1サイクル、95°C5秒、

60°C30秒を 40 サイクルのプロトコルで行った。標的遺伝子の発現量は  $\Delta\Delta Cq$  法により *mgEfla* 遺伝子の発現量に対する相対値として算出した。得られた *Per2* 遺伝子の発現量を t 検定により 2 つの実験群の発現量を統計的に比較した。なお、本研究では  $P < 0.05$  で統計的に有意差があるとした。

#### 4. 研究成果

(1) *Per2* 遺伝子の発現局在および発現変動：ヤイトハタの受精後 60 時間から 186 時間の各時点において、*Per2* 遺伝子の発現を WISH によって調べた。ヤイトハタ仔稚魚の目におけるメラニン色素の集積は、受精後 90 時間から始まり、同 96 時間から眼全体が黒化した (図 1A)。また、ヤイトハタ仔稚魚における開口は受精後 96 時間から見られた。

脳内における *Per2* 遺伝子の発現は、手綱核 (Habenula; Hb)、嗅球 (Olfactory bulb; OB)、視交叉上核 (SCN) および松果体 (PG) に確認された (図 1B)。手綱核、嗅球、および視交叉上核における同遺伝子の発現は、受精後 96 時間から確認され、受精後 108 時間を除いてすべての時点で見られた (図 1B)。一方、松果体における *Per2* 遺伝子の発現は受精後 90 時間から見られた (図 1B)。この部位における *Per2* 遺伝子の発現は暗期 (受精後 96 と 120 時間) に減少し、明期 (受精後 114 と 132 時間) に増加する日周変動を示した (図 1C)。

本種の SCN では *Per2* 遺伝子は周期的な発現変動を示さず、ヤイトハタにおいては SCN に主時計が存在しない可能性が高い。魚類の SCN における *Per2* 遺伝子発現の周期性について、いくつかの魚種において研究が行われている。WISH によって仔魚期のゼブラフィッシュの *Per2* 遺伝子の発現を 4 時間間隔で調べたところ、胚間に染色の有意な変動は観察されず、SCN において *Per2* 遺伝子の発現は確認されなかった (Delaunay et al., 2003)。この結果は、*Per2* 遺伝子発現の周期性の有無という観点において本研究の結果と一致した。すなわち、本種においてもメダカやゼブラフィッシュと同様に SCN 以外の領域に主時計が存在する可能性が考えられた。一方、ヒラメ仔魚を用いた先行研究では、*Per2* 遺伝子の発現を WISH によってヒラメの胚を受精後 48 時間から 174 時間まで調べた。その結果ヒラメは受精後 96 時間から SCN における *Per2* 遺伝子発現に、明期に発現が高くなり暗期に発現が消失する周期性が確認され、恒暗条件下でも変動が維持されることが明らかとなった。以上の結果から、魚類の主時計の存在部位は種によって異なることが示唆される。

松果体においては、*Per2* 遺伝子は受精後 90 時間に発現が始まり、明期に高く、暗期に低い発現変動を示した。この結果から、本種の概日時計の主時計が松果体にあり、受精後 90 時間あたりで時計が形成されている可能性があった。魚類の松果体における *Per2* 遺伝子発現の周期性について様々な魚種で調べられている。クサフグ *Takifugu niphobles* の松果体において、恒暗条件

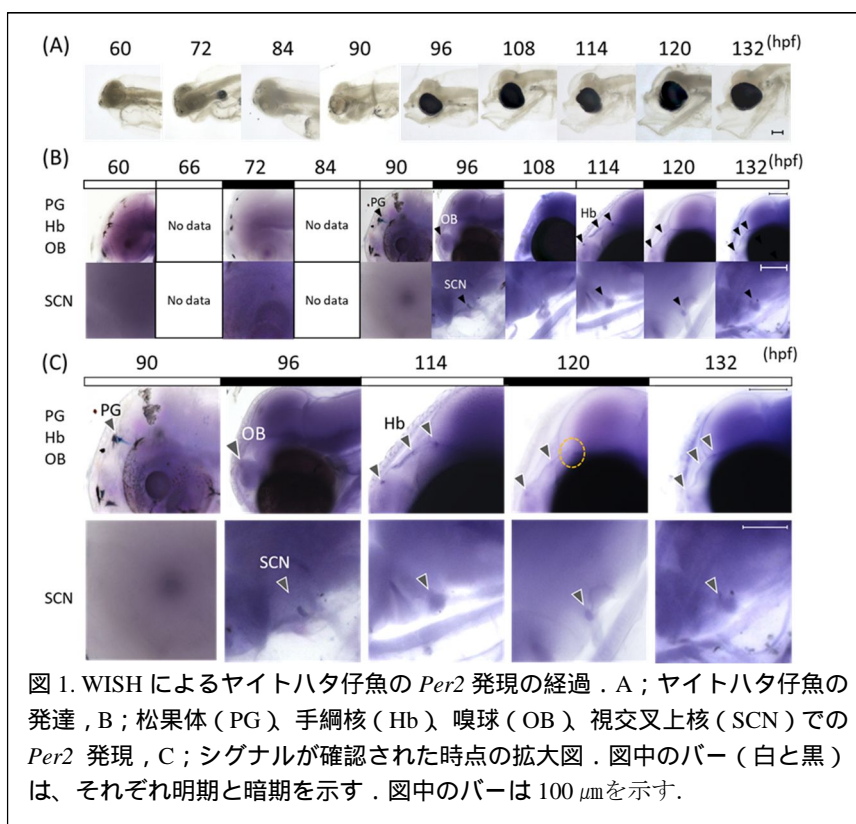


図 1. WISH によるヤイトハタ仔魚の *Per2* 発現の経過。A; ヤイトハタ仔魚の発達, B; 松果体 (PG)、手綱核 (Hb)、嗅球 (OB)、視交叉上核 (SCN) での *Per2* 発現, C; シグナルが確認された時点の拡大図。図中のバー (白と黒) は、それぞれ明期と暗期を示す。図中のバーは 100  $\mu\text{m}$  を示す。



下でメラトニン受容体 (MelR) 遺伝子の発現パターンを解析した結果、MelR 遺伝子は、約 15 時間周期のウルトラディアンリズムを示し、また *Period* 遺伝子の発現周期は 24 時間の日周変動パターンを示し、主時計は松果体に存在することが示唆された (Ikegami et al., 2015)。この結果は *Period* の発現に周期性が確認された点で本研究の結果と一致した。今後は松果体が主時計として機能していることを明らかにするために、松果体における *Per2* 遺伝子の発現変動が恒常条件下においても維持されるかを調べる必要がある。

(2) *Per2* 遺伝子の脳内発現変動：ヤイトハタ幼魚期の松果体における *Per2* 遺伝子の発現量を qPCR 法および ISH によって調べた。qPCR 法によって、松果体における *Per2* 遺伝子の有意な昼夜変動は検出されなかったが、昼に高く、夜に低い発現量の傾向が見られる結果となった (図 2A)。SCN における *Per2* 遺伝子の発現については ISH 法を用いて発現解析を試みたが、組織上での十分な発現シグナルが得られなかった。さらに、恒暗条件における *Per2* 遺伝子の発現変動については、松果体での昼夜変動の傾向が消失することが明らかとなった (図 2B)。以上の実験の結果から、ヤイトハタの脳内における *Per2* 遺伝子は松果体において昼夜変動を示し、その変動は恒暗条件によって消失することが明らかとなった。すなわち、ヤイトハタの松果体における *Per2* 遺伝子に関しては、環境光による転写制御下にあることが示唆された。魚類の松果体における *Per2* 遺伝子の発現についてはいくつかの先行研究が行われており、定量 PCR 法によってゴマアイゴ *Siganus guttatus* の培養松果体における *Per2* 遺伝子の発現量が光曝露によって影響されることを明らかにしている (Sugama et al., 2008)。

その上、明暗条件で馴致された仔魚期のゼブラフィッシュを恒暗条件へと移して WISH によって松果体の *Per2* 遺伝子の発現を調べた結果、本研究の結果と同様に、明暗条件で見られた発現変動が消失することが分かっている (Ziv et al., 2005)。以上のことから、魚類の松果体において見られる *Per2* 遺伝子の昼夜変動は光による転写制御によるものであると考えられる。従って、松果体が単独で主時計としての機能を備える器官である可能性は低いと考えられた。

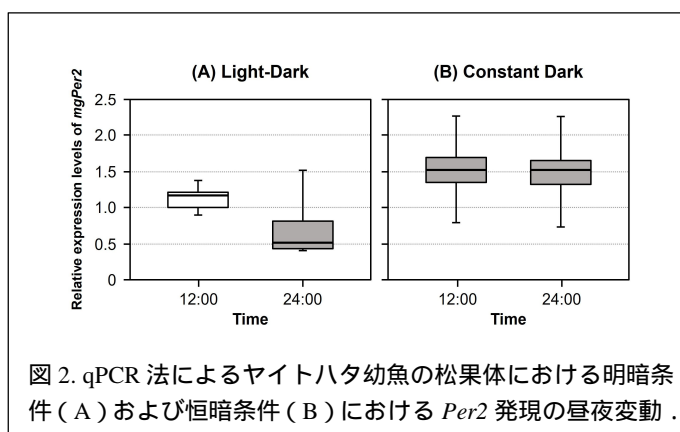


図 2. qPCR 法によるヤイトハタ幼魚の松果体における明暗条件 (A) および恒暗条件 (B) における *Per2* 発現の昼夜変動。

#### <引用文献>

- Delaunay F, Thisse C, Thisse B, Laudet V (2003) Differential regulation of *Period 2* and *Period 3* expression during development of the zebrafish circadian clock. *Gen Exp Patt* 3, 319-324.
- Fukushiro M, Takeuchi T, Takeuchi Y, Hur SP, Sugama N, Takemura A, Kubo Y, Okano K, Okano T (2011) Lunar phase-dependent expression of cryptochrome and a photoperiodic mechanism for lunar phase-recognition in a reef fish, goldlined spinefoot. *PLoS One* 6, e28643.
- 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.
- Sugama N, Park JG, Park YJ, Takeuchi Y, Kim SJ, Takemura A (2008) Moonlight affects nocturnal *Period2* transcript levels in the pineal gland of the reef fish *Siganus guttatus*. *J Pineal Res* 45, 133-141.
- Takemura A, Rahman MS, Park YJ (2010) External and internal controls of lunar-related reproductive rhythms in fishes. *J Fish Biol* 76, 7-26.
- Ziv L, Levkovitz S, Toyama R, Falcon J, Gothilf Y (2005) Functional development of the zebrafish pineal gland: light-induced expression of *period2* is required for onset of the circadian clock. *J Neuroendocrinol* 17, 314-320.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Mahardini A, Rizki D, Byun JH, Yamauchi C, Takeuchi Y, Takemura A	4. 巻 333
2. 論文標題 Food availability alters expression profiles of genes in relation to reproduction and nutrition in the females of tropical damselfish ( <i>Chrysiptera cyanea</i> )	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Zoology	6. 最初と最後の頁 619-628
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jez.2409	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamauchi C, Takeuchi Y, Takemura A	4. 巻 20
2. 論文標題 Effects of long-afterglow-phosphorescent pigments on growth stimulation in spinefoot juveniles	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Aquaculture Studies	6. 最初と最後の頁 157-164
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.4194/2618-6381-v20_1_02	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yamashina, F., Takeuchi, Y., Fukunaga, K., Udagawa, S., Tan, Ee Suan, Byun, JH, Yamauchi, C., Takemura, A.	4. 巻 280
2. 論文標題 Daily expression of a clock gene in the brain and pituitary of the Malabar grouper ( <i>Epinephelus malabaricus</i> )	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 9-14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygcen.2019.03.019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Zhu, Y., Morita, N., Negishi, R., Maruyama, S., Kaneko, J., Shimabukuro, A., Takemura, A
2. 発表標題 Effect of light and salinity on growth of the malabar grouper <i>Epinephelus malabaricus</i>
3. 学会等名 The 6th International Conference on Tropical and Coastal Region Eco Development 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹村明洋
2. 発表標題 サンゴ礁から学ぶこと
3. 学会等名 生物リズム若手の集い2020 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 竹村明洋
2. 発表標題 月光が操るサンゴ礁生物のリズム
3. 学会等名 第42回日本光医学・光生物学会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹村明洋
2. 発表標題 光が拓く新たな養殖業
3. 学会等名 第5回「農水産業支援技術展」沖縄
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹村明洋
2. 発表標題 JST共創の場プロジェクト
3. 学会等名 琉大SDGsシンポジウム2020 ~ 研究から広がるSDGs ~
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹村明洋
2. 発表標題 資源循環型共生社会実現に向けた農水一体型サステナブル陸上養殖プロジェクト
3. 学会等名 サステナブル陸上養殖技術シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 1.福永耕大・山科芙美香・竹村明洋・太田菜月・竹内悠記
2. 発表標題 カンモンハタにおける生殖関連遺伝子の月周期性変動とメラトニンの月光情報伝達因子としての役割
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<a href="http://www.takemura-lab.jp">http://www.takemura-lab.jp</a>
---

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	武方 宏樹  (Takekata Hiroki)  (60814192)	琉球大学・戦略的研究プロジェクトセンター・特命助教    (18001)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件



8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------