

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570058

研究課題名(和文) クサフグの月周同調産卵回遊を制御する神経内分泌基盤の解明

研究課題名(英文) Neuroendocrine basis of lunar-synchronized spawning migration in grass puffer

研究代表者

安東 宏徳 (ANDO HIRONORI)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：60221743

研究成果の概要(和文)：クサフグの月周に同調した産卵回遊行動を調節する脳内機構を明らかにするため、間脳の視床下部神経内分泌系と松果体の働きを解析した。視床下部の生殖中枢から分泌される複数の神経ホルモンの合成は、産卵期に著しく高まると共に明瞭な日周変動を示した。この日周リズムは、松果体から周期的に分泌されるメラトニンによって調節されることが示唆された。また、松果体のメラトニン受容体の合成は14時間周期のリズムを持つと共に、月周に依存した変動を示すことが分かった。さらに、産卵期のクサフグは水位を一定にした水槽内でも月周に同調して集合することが分かり、松果体で駆動される内因性の月周リズムを持つことが示唆された。

研究成果の概要(英文)： To establish molecular basis of neuroendocrine control of lunar-synchronized spawning migration in grass puffer, we assessed changes in magnitudes of gene expression for various neurohormones and their receptors in the hypothalamus and pineal gland. In the hypothalamus, the expressions of those genes significantly increased during the spawning period and showed diurnal and circadian variations in association with changes in expression of melatonin receptor gene. In the pineal gland, melatonin receptor gene showed unique rhythmic expressions with 14 hours cyclicity and monthly variations. Observations of spawning behavior in spawning grounds and in aquarium revealed that the spawning rhythm is endogenously maintained possibly under the control of the circalunar clock in the pineal gland.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生殖内分泌学，神経内分泌学

科研費の分科・細目：基礎生物学・形態・構造

キーワード：産卵回遊，生殖リズム，松果体，メラトニン，GnRH，キスペプチン，GnIH

1. 研究開始当初の背景

魚類の産卵行動や性成熟は、光や温度、季節などの環境要因によって調節されており、一回産卵から多回産卵まで様々なリズムを

持っている。感覚系から入力された環境情報は脳内で統合されて、間脳の視床下部にある生殖中枢の機能が調節されることにより産卵リズムが作られると考えられるが、その脳

内メカニズムは未だ不明の点が多い。脊椎動物では、生殖機能を調節する体のシステムは、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(GnRH)-生殖腺刺激ホルモン(GTH)-性ステロイドホルモン系である。GnRHは、視床下部から分泌される神経ホルモンであり、産卵行動を刺激すると共に性ステロイドと協調してGTHの分泌を調節して生殖腺の成熟を促すことがサケ科魚類などで明らかにされている。

一方、産卵リズムについては松果体から分泌されるメラトニンが重要である。メラトニンの合成は光に依存して変化し、夜に血中レベルが高くなる。メラトニンが直接GnRHニューロンに作用することが報告されているが、疑問視されている。また、日周リズムは松果体や網膜に存在する体内時計によって調節され、PeriodやCLOCKなどの時計遺伝子の転写調節ループによって駆動されると考えられるが、これらの時計遺伝子とGnRHニューロンとの関係は不明である。

さらに近年になって、キスペプチンや生殖腺刺激ホルモン放出抑制ホルモン(GnIH)というGnRHニューロンの機能を調節する神経ペプチドが発見された。特に、GnIHはメラトニンによって調節を受けることやGnRHニューロンに作用することが報告されており、産卵行動の発現リズムに重要な機能を担っている可能性がある。

このような背景の中で、クサフグの産卵回遊の中枢制御についての研究を着想した。クサフグは、春から夏の産卵期に大潮、すなわち新月と満月の日の満潮前に海岸で集団産卵をする。この月周同調産卵という特徴的な産卵リズムを持つクサフグは、産卵リズムの脳内メカニズムの解明のよい実験モデルとなる。本研究課題を申請する前の4年間、クサフグの産卵行動の調査を行い、福岡県志賀島と熊本県富岡に数千匹が集まるポイントを見つけて、魚が産卵場に集まる場所と時間を特定した。また、非産卵期にも魚を入手する方法を確立した。

2. 研究の目的

月周に同調した産卵リズムを持つクサフグは、いつ満潮になるかを知っており、満潮前の数時間に産卵できるように海岸の産卵場に向けて回遊行動を起こす。この月周と日周に依存した計時機構の解明、またそれと産卵行動発現システムとの連携の分子機構を明らかにすることが、本研究の大きな目的である。本申請課題では、GnRHニューロンを中心とする視床下部の生殖神経内分泌系の神経基盤を確立すると共に、産卵行動リズムの形成に重要な松果体の機能の基盤的解明を目的とした。

具体的には、生殖神経内分泌系の基盤的解析として、GnRH、キスペプチン、GnIHの遺伝

子の構造解析と発現の周期的変動を明らかにした。また、松果体の機能の基盤的解析として、メラトニンの周期的分泌とメラトニン受容体の遺伝子の構造解析と発現の周期的変動を明らかにした。また、月周リズムを刻む内因性の計時機構の働きを調べるため、産卵期に水槽内で魚を飼育し、一定の実験条件で産卵行動を観察した。さらに、月周同調産卵リズムの調節に関わる因子の働きを検証するフィールド実験系を確立するため、産卵回遊行動の回帰性を検討した。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子クローニングと配列決定

視床下部の神経ホルモンとその受容体、また、松果体で発現する時計遺伝子、メラトニン合成酵素、メラトニン受容体の遺伝子をクローニングして、その塩基配列を決定した。各遺伝子共に、最初にトラフグのゲノムデータベースを検索し、相同な遺伝子を*in silico*クローニングした。トラフグの遺伝子配列を基にしてプライマーを設計し、クサフグのゲノムDNA、間脳あるいは松果体由来のcDNAを鋳型にしてPCR法によって遺伝子をクローニングした。また、3'-RACE法及び5'-RACE法によって、mRNAの全長の配列を決定した。配列を決定した遺伝子は下のとおりである。

神経ホルモンとその受容体: GnRH1, GnRH2, GnRH3, Kiss2, Kiss1r (Kiss2受容体), LPXRFa (GnIH), LPXRFa-R (LPXRFa受容体)
時計遺伝子: Per1b, Per2a, Per2b, Per3
メラトニン合成酵素: AANAT1, AANAT2
メラトニン受容体: Mell1a_{1,4}, Mell1a_{1,7}, Mell1b, Mell1c

(2) 遺伝子の発現解析

① mRNA量の測定系の確立

各遺伝子の発現レベルの変化を定量的に解析するため、リアルタイムPCR法によるmRNA量の測定系を確立した。

② 発現の季節変動

クサフグを非産卵期の9月と12月、産卵期前の4月、産卵期の5月、産卵期後の7月に採集し、脳と血液、生殖腺を採取した。間脳領域のトータルRNAを抽出し、その中に含まれる神経ホルモンとその受容体のmRNA量を測定した。また、血漿中の性ステロイドホルモン濃度を酵素免疫測定法によって測定した。さらに、生殖腺の組織像を観察して、生殖腺の成熟度合いを調査した。

③ 発現の日周変動と概日変動

産卵期にクサフグを自然日長下(14L:10D)で飼育し、3時間おきに脳を採取した。脳試料から間脳領域と松果体を切り出し、その中

に含まれる各遺伝子の mRNA 量を測定した。また、魚を恒暗条件下で飼育し、同様にして概日変動を解析した。

④ 発現の月周変動

産卵期にクサフグを自然日長下 (14L:10D) で飼育し、4日あるいは5日おきに1ヵ月間、同時刻に脳を採取した。採取時刻は、明期開始後9時間 (ZT9時, 明期) と18時間 (ZT18時, 暗期) の二通りの条件で行った。脳試料から松果体を切り出し、その中に含まれる Period, ANAT, メラトニン受容体の各遺伝子の mRNA 量を測定した。

(3) メラトニン分泌の解析

松果体を採取し、培養液を灌流させながら初代培養を行った。光条件を自然日長条件及び恒暗条件として松果体を培養後、培養液を1時間ごとに回収し、培養液中に分泌されたメラトニン量を、高速液体クロマトグラフィーを用いて測定した。

(4) 水槽内における産卵行動の観察

志賀島及び富岡の産卵場に集まったクサフグを採集し、水槽の底面の半分に小石を積み上げて斜面を作った中で飼育した。雄10匹と雌2匹を水槽に入れて、自然日長下、水位一定の条件下で行動をビデオ観察した。観察は、大潮と小潮の日の満潮前と干潮前に90分間行った。クサフグの行動を次の4パターンに分けて、それぞれの観察における各行動パターンの割合を比較した：斜面に留まる、砂の上に留まる、泳ぐ、砂に潜る。

(5) 産卵回遊の回帰性の検討

富岡の産卵場に集まったクサフグを採集し、カラーピンで標識した後、放流した。翌日もしくは2週間後の大潮の日に同じ場所で魚を採集し、産卵場に回帰した標識個体の数を調べた。

4. 研究成果

(1) 間脳の視床下部神経内分泌系に関する研究成果

① 神経ホルモンとその受容体の遺伝子発現量の季節変動

クサフグの生殖腺の成熟は12月から開始し、4月から産卵期の5月にかけて進行した。産卵期後の7月には生殖腺は退行していた。血液中の性ステロイドホルモン濃度は、12月から5月にかけて上昇し、7月には12月と同じレベルまで低下した。この過程において、神経ホルモンとその受容体の遺伝子はそれぞれ異なる発現パターンを示した。

GnRH1 の mRNA 量は、雌雄共に産卵期の5月に著しく上昇した。また、産卵場で採集した魚の脳内でも5月と同程度の高いレベルを示

した。Kiss2 と Kiss1r の mRNA 量も5月と産卵魚で高かった。下垂体中の濾胞刺激ホルモン (FSH) β サブユニットと黄体形成ホルモン (LH) β サブユニットの mRNA 量も5月と産卵魚で著しく高かった。これらの結果から、キスペプチンは、GnRH1 を介して下垂体の FSH と LH の分泌を刺激し、生殖腺の発達を促進することが示唆された。

一方、GTH の分泌を抑制することが哺乳類や鳥類で報告されている LPXRFa とその受容体の遺伝子の発現は4-5月で上昇したが、産卵魚では低かった。また、LPXRFa は下垂体で FSH β と LH β の遺伝子発現を促進することが分かり、LPXRFa は産卵前の段階で性成熟の促進に働くことが示唆された。

② 神経ホルモン及びその受容体の遺伝子発現量の日周及び概日変動

Kiss2 と LPXRFa の遺伝子発現は、間脳で明期に1つのピークを持つ明瞭な日周変動をしていた。また、恒暗条件下では主観的暗期に1つのピークを持つ明瞭な概日変動をしていた。さらに、両神経ホルモンの受容体も同期した変動パターンを示した。GTH 分泌を刺激する両神経ホルモンの発現とその作用は、概日時計と光によって調節されると考えられる。

③ メラトニン受容体の遺伝子発現量の日周及び概日変動

4種類のメラトニン受容体サブタイプの遺伝子発現は、間脳で暗期に1つのピークを持つ日周および概日変動を示した。間脳におけるメラトニンの作用は日周変動し、暗期に強いと考えられる。

(2) 松果体に関する研究成果

① メラトニン合成と分泌の日周及び概日変動

初代培養した松果体からメラトニンは、暗期に分泌量が高まり、明期に入ると急激に低下した (図1)。また、恒暗条件下でも、主観的暗期に1つのピークを

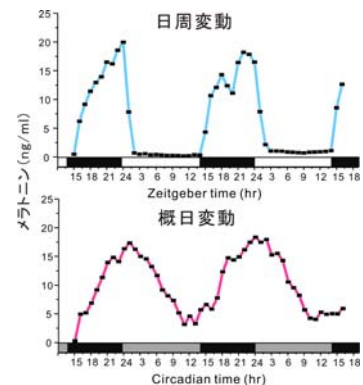


図1. メラトニンの分泌パターン

持つ概日変動を示した。メラトニン合成の律速酵素である AANAT2 の遺伝子発現も同様のパターンを示した。

② Period 遺伝子の発現量の日周、概日及び月周変動

4種類のPeriod遺伝子サブタイプの発現は、明暗条件下では1つもしくは2つのピークを持つ日周変動を示した。恒暗条件下では主観的明期に1つのピークを持つ概日変動を示した。クサブグの松果体において概日時計が駆動し、Periodがその要素の1つとして機能していると考えられる。また、発現レベルの月周変動を調べたが、ZT9時とZT18時共に月周に依存した変動は見られなかった。

③ メラトニン受容体の遺伝子発現量の日周、概日及び月周変動

4種類のメラトニン受容体サブタイプの遺伝子発現は、松果体で日周変動したが、ピークの時間はサブタイプによって異なっていた。恒暗条件下では、4種類のサブタイプ遺伝子は同期して14時間周期の変動を示した。また、暗期において月齢5.7日をピークとする月周変動を示した。

(3) 水槽内における産卵行動の観察

産卵期にクサブグを水槽内で飼育し、行動をビデオ観察した。水位を一定にし、水槽を窓際において自然日長下で飼育した。志賀島の産卵場で採集した魚を2か月間飼育して観察した結果、産卵は見られなかったが、大潮の日の満潮前に小石で作った斜面に集まること分かった(図2)。クサブグの行動の中に占める集合行動の割合を、大潮の日の満潮前と大潮の日の干潮前、小潮の日の満潮・干潮前で比較すると、大潮の日の満潮前は有意に高かった。フィールドにおける月周と同調した産卵場への集合行動が水槽内でも再現された。

一方、富岡の産卵場で採集した魚を観察した結果、大潮の日の満潮前には遊泳行動の割合が高まった。富岡では、魚は満潮前に産卵場の周囲を群泳する。水槽内での遊泳行動は、フィールドでの群泳行動に関連していると

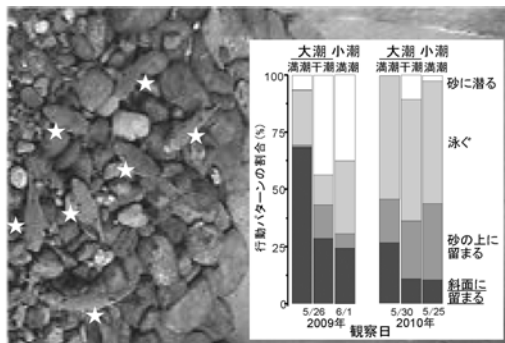


図2. 水槽内におけるクサブグの集合行動。魚に★を示す。

考えられる。志賀島と富岡の魚の水槽内での行動変化は2年続けて再現された。クサブグは産卵期には内因性の月周産卵リズムを強

く持つと考えられる。

(4) 産卵回遊の回帰性

月周産卵行動を調節する脳内分子の機能を検証するフィールドの行動実験系の基礎的情報として、産卵場への回帰性を検討した。富岡の産卵場に集まった魚を採集し、背びれの下にカラーピンを装着して標識放流した(図3)。標識した魚の約10%の魚が翌日に、約3%の魚が2週間後の大潮の日に放流地点に回帰した。また、約700m離れた場所にある2か所の産卵場の魚を異なる色のカラーピンで標識して同時に放流した結果、大部分の魚は標識された産卵場に回帰した。クサブグは、生まれた川に産卵回帰するサケと同程度に高い回帰性を持つことが明らかになった。



図3. カラーピンによる標識

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42件)

- ① Shahjahan, Md., Ikegami, T., Osugi, T., Ukena, K., Doi, H., Hattori, A., Tsutsui, K., Ando, H. (2010). Synchronized expressions of LPXRFamide peptide and its receptor genes: seasonal, diurnal and circadian changes during spawning period in grass puffer. *J. Neuroendocrinol.* 23: 39-51. 査読有
- ② Shahjahan, Md., Motohashi, E., Doi, H., Ando, H. (2010). Elevation of Kiss2 and its receptor gene expression in the brain and pituitary of grass puffer during the spawning season. *Gen. Comp. Endocrinol.* 169: 48-57. 査読有
- ③ Shahjahan, Md., Hamabata, T., Motohashi, E., Doi, H., Ando, H. (2010). Differential expression of three types of gonadotropin-releasing hormone genes during the spawning season in grass puffer, *Takifugu niphobles*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 167: 153-163. 査読有
- ④ Motohashi, E., Yoshihara, T., Doi, H., Ando, H. (2010). Aggregating behavior of grass puffer, *Takifugu niphobles*, observed in aquarium during the spawning period. *Zool. Sci.* 27: 559-564. 査読有
- ⑤ Chowdhury, V. S., Yamamoto, K., Ubuka, T., Bentley, G. E., Hattori, A., Tsutsui, K. (2010). Melatonin stimulates the

release of gonadotropin-inhibitory hormone by the avian hypothalamus.

Endocrinology 151: 271-280. 査読有

- ⑥ Ikegami, T., Motohashi, E., Doi, H., Hattori, A., Ando, H. (2009). Synchronized diurnal and circadian expressions of four subtypes of melatonin receptor genes in the diencephalon of a puffer fish with lunar-related spawning cycles. **Neurosci. Lett.** 462: 58-63. 査読有
- ⑦ Ikegami, T., Azuma, K., Nakamura M., Suzuki, N., Hattori, A., Ando, H. (2009). Diurnal expressions of four subtypes of melatonin receptor genes in the optic tectum and retina of goldfish. **Comp. Biochem. Physiol. Part A**, 152: 219-224. 査読有
- ⑧ Motohashi, E., Hamabata, H., Ando, H. (2008). Structure of neurohypophysial hormone genes and changes in the levels of expression during spawning season in grass puffer (*Takifugu niphobles*). **Gen. Comp. Endocrinol.** 155: 456-463. 査読有
- ⑨ Suzuki, N., Somei, M., Seki, A., Reiter, R. J., Hattori, A. (2008). Mini Review: Novel bromomelatonin derivatives as potentially effective drugs to treat bone diseases. **J. Pineal Res.** 45: 229-234. 査読有

[学会発表] (計77件)

- ① Ando, H., Neuroendocrine regulation of spawning migration in grass puffer. 中国農業大学生物学院特別セミナー, 2010年8月, 北京
- ② Ando, H. and Urano, A., Neuroendocrine mechanisms of spawning migration in salmonids. 9th International Congress of the Biology of Fish, 2010年7月, バルセロナ
- ③ 服部淳彦, メラトニンの効果と各種食材に含まれるメラトニン. 日本抗加齢医学会総会, 2010年6月, 京都
- ④ Ando, H., Neuroendocrine regulation of spawning behavior in grass puffer, *Takifugu niphobles*. 中国動物学会比較内分泌学分会第八回学術会議, 2009年9月, 麗江
- ⑤ Hattori, A., Melatonin and Anti-aging. YIES Symposium "Biorhythms and Health", 2009年7月, 山梨

[図書] (計5件)

- ① 鈴木信雄, 田畑純, 服部淳彦, 身近な動物を使った実験1、第3章 キンギョ. (鈴木範男編), 三共出版, 2009年, 46ページ

[産業財産権]

○取得状況 (計2件)

名称: Tryptophan derivative and application thereof.

発明者: 染井正徳、服部淳彦、鈴木信雄

権利者: 染井正徳、服部淳彦、鈴木信雄

種類: Patent

番号: US 7,659,304 B2

取得年月日: 2010年2月

国内外の別: 国外 (アメリカ)

[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)

九州大学・大学院農学研究院・准教授

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

(3) 連携研究者

なし