

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 1 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2012

課題番号：21380117

研究課題名（和文）魚類における生殖制御脳内ネットワークの機能的ゲノミクス解析

研究課題名（英文）Functional genomics analyses on reproductive brain in fish

研究代表者

飯郷 雅之 (IIGO MASAYUKI)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：10232109

研究成果の概要（和文）：季節繁殖を行う温帯域の魚類と通年繁殖可能な熱帯域の魚類の生殖制御システムはいったいどこが共通でどこが異なるのだろうか？また、季節繁殖を行う魚類のうち、長日繁殖型魚類と短日繁殖型魚類の生殖制御システムはいったいどこが共通でどこが異なるのだろうか？本研究では周年産卵型のゼブラフィッシュ、長日繁殖型（春産卵型）のメダカ、短日繁殖型（秋産卵型）のアユとサクラマスを実験対象とし、これらの魚種の生殖制御脳内ネットワークを比較しながら研究を進めた。

研究成果の概要（英文）：Functional genomics analyses were performed to elucidate the mechanisms regulating seasonal reproduction in fish. Reproductive brain functions were compared among three types: annual breeder (zebrafish *Danio rerio*), long-day breeder (medaka *Oryzias latipes*), and short-day breeder (ayu *Plecoglossu altivelis* and masu salmon *Oncorhynchus masou masou*).

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	7,500,000	2,250,000	9,750,000
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2012年度	2,400,000	720,000	3,120,000
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：生殖内分泌学，時間生物学，光生物学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：季節繁殖，脳内ネットワーク，機能的ゲノミクス，生殖制御，水産学的脳科学

1. 研究開始当初の背景

(1) 水産学的脳科学研究推進の必要性

脳機能の研究が重要であることは言を待たない。記憶・学習などのいわゆる「高次脳機能」研究に世間一般の眼は向きがちであるが、農学研究分野においては、より効率的に生物生産を行うための基礎研究として本能を司る脳機能（ここではあえて「低次」脳機能と呼ぶ）を解析することが重要である。すなわち、摂食、代謝・成長、渡り、回遊、生殖、生物時計など、本能的生物機能の調節に

は脳機能が深く関与しており、低次脳機能の解明は農学分野における生物生産の効率化に資するところ大である。このような「農学的脳科学」研究の推進は生物生産の改善に必ずや益するものであるが、「低次脳機能」研究はこれまで断片的にしか行われてこなかったのが現状である。水産学研究分野においても、脳機能の理解と解明から魚類の増養殖の効率化を目指す「水産学的脳科学」研究の推進が必要である。

(2) 季節繁殖の脳内ネットワーク

魚類の生殖は脳（視床下部）-下垂体-生殖腺系により制御されている。脳の性中枢に発現する生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）による下垂体の生殖腺刺激ホルモン（GTH）分泌制御機構、さらには GTH による卵巣・精巣機能の制御について多くの知見が積み上げられてきた。しかしながら、環境情報がいかにして脳-下垂体-生殖腺系を制御しているのかについては不明な点が多いのが現状である。そこで申請者は魚類を含む脊椎動物を対象として、環境による生殖生理の制御システムの全貌解明を目指して研究を推進してきた。生殖リズムの確立における光、水温など環境の役割や、光情報の脳内伝達機構について松果体ホルモンであるメラトニンや光受容体を対象に研究を進め、最近では体内時計・光周時計の時刻情報を支配する時計遺伝子の研究を進めている。環境情報の受容から生殖制御に至る脳内ネットワークの全貌についてはいまだ明らかになっていない。

(3) 季節繁殖を司る鍵分子の同定

温帯域に生息する脊椎動物の多くは日長の長日化、あるいは日長の短日化にあわせて季節繁殖を行う。前者は長日繁殖型（春産卵型）、後者は短日繁殖型（秋産卵型）と呼ばれるが、この季節繁殖を制御する脳内分子機構は脊椎動物を通じて長年の謎であった。名古屋大学吉村崇教授の研究グループと共同で我々は、長日刺激により鳥類（ウズラ）の脳内に発現する甲状腺ホルモン転換酵素 iodothyronine deiodinase type II (Dio2) が季節繁殖を行う脊椎動物の繁殖期決定の鍵分子であることを発見した。Dio2 は鳥類のみならず、魚類や哺乳類の季節繁殖の中枢に位置する分子であることが最近の申請者らの研究によりわかってきた。また、2008 年 3 月にはウズラの Dio2 を制御する因子は下垂体隆起葉に発現する甲状腺刺激ホルモン（TSH）であることを DNA マイクロアレイによる機能的ゲノミクス解析により明らかにした。

(4) 季節繁殖を司る KISS-GPR54 システム

哺乳類を対象とした近年の研究により、ガン抑制遺伝子として同定された *KISS1* 遺伝子のコードするペプチド kisspeptin（別名 metastin）がその受容体と新たに同定された GPR54 に結合して脳内の生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン分泌の促進し、春期発動に関与することが判明した。すなわち、kisspeptin は生殖制御の中枢的因子であり、その作用は魚類でも保存されていると予測された。しかしながら、魚類の kisspeptin に関する研究報告は申請者が知る限りこれまでになかった。そこで申請者は魚類の *KISS1* 遺伝子と

kisspeptin 受容体(GPR54)をメダカより cDNA クローニングすることに成功した。また、現在はサケ科魚類、アユ、キンギョなどを対象に研究を進めている。GPR54 受容体のアゴニスト・アンタゴニストを開発できれば、魚類の生殖を自由にコントロールすることが可能になると期待される。

2. 研究の目的

季節繁殖を行う温帯域の魚類と通年繁殖可能な熱帯域の魚類の生殖制御システムはいったいどこが共通でどこが異なるのだろうか？また、季節繁殖を行う魚類のうち、長日繁殖型魚類と短日繁殖型魚類の生殖制御システムはいったいどこが共通でどこが異なるのだろうか？本研究においては、生殖内分泌学および分子生物学的手法を駆使して、魚類の生殖制御に関わる脳内ネットワークを包括的に比較解明し、魚類の生産技術の高度化・効率化に資するための基礎的知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 脳内で発現する遺伝子のカタログ化

アユの脳を対象として、完全長 cDNA を作成し、5' -Expression Sequence Tag (EST) の塩基配列を網羅的に解析し、脳内で発現する遺伝子のカタログを作成した。

(2) 周年産卵魚、長日繁殖魚、および短日繁殖魚の脳内において日長変化に応じて発現量の変化する遺伝子（季節繁殖制御遺伝子）の DNA マイクロアレイによる網羅的同定

長日条件下で飼育した魚と短日条件下で飼育した魚を対象として、DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析（トランスクリプトーム解析）を行い、日長変化の前後で時間経過を追って発現が量的・質的に変化する遺伝子群を同定を試みた。

(3) オプシン遺伝子群、時計遺伝子群、*Dio2*, *TSHB*, *KISS*, *GPR54* など季節繁殖に関わる遺伝子群（季節繁殖関連遺伝子群）の網羅的 cDNA クローニング

光受容体であるオプシン遺伝子群、季節繁殖制御の中枢遺伝子である *Dio2*, *Dio2* の制御因子である *TSH*, 生殖制御中枢因子である kisspeptin をコードする *KISS*, ならびにその受容体である *GPR54* など季節繁殖に関わる遺伝子群の網羅的 cDNA クローニングを行った。

(4) 季節繁殖制御関連遺伝子群の脳内発現部位のマッピングと発現量の変動

オプシン遺伝子群、ならびに *Dio2*, *TSHB*, *KISS*, *GPR54* などの発現部位と発現量の変動を、長日条件下および短日条件下で飼育した

周年産卵魚，長日繁殖魚，および短日繁殖魚を対象として ³³P で標識したオリゴプローブもしくはジゴキシゲニン標識 cRNA プローブを用いた *in situ* ハイブリダイゼーションにより網羅的に調べた。また，リアルタイム PCR 法による発現量の変化の確認も行った。

(5) 季節繁殖制御遺伝子群産物の局在と動態の解明

季節繁殖制御遺伝子群の産物であるオプシン類，Dio2，TSHB タンパク質に対する抗体を作成し，脳内における分布と発現量の変動を免疫組織化学やウエスタンブロットにより調べた。

4. 研究成果

(1) 脳内で発現する遺伝子のカタログ化

アユの脳由来の完全長 cDNA ライブラリーから 1920 クローンの塩基配列 (5' -EST) を決定し，脳内で発現する遺伝子のカタログを作成した。これらの中には，CNP，NPY，PYY，MCH，AVT，IT，SST などのペプチドホルモン，cJun，Ets などの転写因子が含まれていた。

(2) 周年産卵魚，長日繁殖魚，および短日繁殖魚の脳内において日長変化に応じて発現量の変化する遺伝子 (季節繁殖制御遺伝子) の DNA マイクロアレイによる網羅的同定

長日条件下で飼育した魚と短日条件下で飼育したサクラマスを対象として，DNA マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行い，日長変化の前後で時間経過を追って発現が量的・質的に変化する遺伝子群の同定を試みた。データ解析を現在進めている

(3) オプシン遺伝子群，時計遺伝子群，*Dio2*，*TSHB*，*KISS*，*GPR54* など季節繁殖に関わる遺伝子群 (季節繁殖関連遺伝子群) の網羅的 cDNA クローニング

メダカの *GPR54-1* (*Kissra*)，*GPR54-2* (*Kissrb*)，サクラマスのオプシン遺伝子群 (*RH1*，*SWS1*，*SWS2*，*RH2A*，*RH2B*，*LWS*，*EXORH0*，*OPN4*，*OPN5*，*PARAPINOPSIN B*)，時計遺伝子群 (*CLOCK1A*，*CLOCK1B*，*BMAL1A*，*BMAL1B*)，*Dio2*，*TSHB*，*GnRH3B*，*GPR54-1* (*Kissra*)，アユの *KISS2*，*GPR54-1* (*Kissra*)，*GPR54-2* (*Kissrb*) などの cDNA クローニングを行い，塩基配列を決定した。これらの塩基配列は DDBJ/EMBL/NCBI データベースに登録した (アクセッション番号は AB772406-AB772426)。

(4) 季節繁殖制御関連遺伝子群の脳内発現部位のマッピングと発現量の変動

論文投稿中のため記載を割愛。

(5) 季節繁殖制御遺伝子群産物の局在と動態の解明

論文投稿中のため記載を割愛。

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 0 件)

[学会発表] (計 15 件)

- (1) 大杉知裕，大滝直仁，砂川裕哉，飯郷雅之，天野勝文，筒井和義 (2012) *Kiss1* と *Kiss2* の分子進化に関する研究。第 37 回日本比較内分泌学会。2012. 11. 29-12. 1. 金沢市。
- (2) 飯郷雅之。次世代シーケンサーを活用した非モデル生物のゲノムプロジェクト。第 2 回 NGS 現場の会。2012. 5. 24-25. 吹田市。
- (3) 仲田由香里，藤原麻美，菅琢哉，武田維倫，飯郷雅之。那珂川における天然アユ成熟時の下垂体前葉ホルモン遺伝子発現。第 1 回宇都宮大学オプトバイオシンポジウム。2011. 12. 21. 宇都宮市。
- (4) 仲田由香里，藤原麻美，菅琢哉，武田維倫，飯郷雅之。那珂川における天然アユの成熟と下垂体前葉ホルモン遺伝子発現の変動。日光シンポジウム。2011. 12. 17-18. 日光市。
- (5) 飯郷雅之。魚類をモデルとした生物時計分子機構の解析。日光シンポジウム。2011. 12. 17-18. 日光市。
- (6) 飯郷雅之，仲田由香里，藤原麻美，菅琢哉，船生朝美，橋本蘭夢，本多久楽々，手賀章倫，新井菜津美，武田維倫。那珂川における天然アユの成熟とホルモン遺伝子発現の変動。第 18 回日本時間生物学会学術大会。2011. 11. 24-25. 名古屋市。
- (7) 飯郷雅之。魚類におけるメラトニンの動態。平成 23 年度日本水産学会春季大会。2011. 3. 27-31. 東京都港区 (誌面開催)。
- (8) 飯郷雅之。魚類の系統進化とメラトニンの動態。第 17 回日本時間生物学会学術大会。2010. 11. 20-21. 東京都新宿区。
- (9) 飯郷雅之。水産研究における脳科学研究の推進とその応用。(社) 農林水産先端技術産業振興センター、農林水産省主催 アグリ技術シーズセミナー。2011. 3. 9. 東京都港区。
- (10) 武田維倫，飯郷雅之。本能的脳機能研究の水産学的展開ー機能的ゲノミクスからの新技術開発ー。第 4 回宇都宮大学企業交流会。2010. 9. 6. 宇都宮市。
- (11) 本多久楽々，遠藤真，阿部朋孝，柳沢忠，飯郷雅之。メダカ *Period1* の cDNA クローニングと TILLING による変異体の探索。平成 22 年度日本水産学会春季大会。

2010. 3. 26-30. 藤沢市.
- (12) 飯郷雅之. 魚類における本能的脳機能の機能的ゲノミクス解析. 第9回シンポジウム「水生動物の行動と神経系」. 2010. 1. 23-24. 名古屋市.
- (13) 新井菜津美, 飯郷雅之. 脊椎動物におけるオプシン遺伝子群のクローニング. 第9回シンポジウム「水生動物の行動と神経系」. 2010. 1. 23-24. 名古屋市.
- (14) 大瀧直仁, 恒川賢太, 大杉知裕, 飯郷雅之, 天野勝文, 筒井和義. 魚類のKiSS-2ペプチド: 前駆体 cDNA のクローニングと成熟ペプチドの精製. 第34回日本比較内分泌学会大会日本比較生理生化学会第31回大会合同大会 CompBiol2009. 2009. 10. 22-24. 豊中市.
- (15) 飯郷雅之. 高感度ホルモン測定系の開発とその応用. 第3回宇都宮大学企業交流会. 2009. 9. 4. 宇都宮市.

〔図書〕(計4件)

- (1) 飯郷雅之. シーエムシー出版. 第18章体内時計制御の水産業への応用, 「体内時計の科学と産業応用」(柴田重信監修), 2011, pp. 154-160.
- (2) 飯郷雅之. 朝倉書店. メラトニンの分子機構, 「からだと光の事典」(太陽紫外線防御研究委員会編), 2010, pp. 320-324.
- (3) Iigo M. Wiley-Blackwell. 5.2 Anatomy and Histology, 5.2.4 Endocrine system. Medaka. Biology, Management, and Experimental Protocols (Kinoshita M, Murata K, Naruse K, Tanaka M, eds), 2009, pp. 140-150.
- (4) 飯郷雅之. シュプリンガーフェアラーク東京魚類の光周性, 「光周性の分子生物学」(海老原史樹文, 井澤毅編), 2009, pp. 131-140.

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
http://agri.mine.utsunomiya-u.ac.jp/hpj/deptj/chemj/seimei_hp/p_iigo.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: