

## 論文の内容の要旨

水圏生物科学 専攻

平成 11 年度博士課程 進学

氏 名 水澤寛太

指導教官 会田勝美

論文題目 魚類におけるメラトニンリズムの調節機構に関する研究

メラトニンは脊椎動物の松果体や網膜などで合成される *N*-アセチル-5-メキソトリプタミンの構造を持ったインドール化合物であり、その合成・分泌量が日中に低く夜間に高い日周リズムを示すことから体内に時刻情報を伝達するホルモンであると考えられている。多くの動物において、メラトニン分泌は光によって強く抑制され、また恒暗条件下においては約 24 時間周期のリズム(概日リズム)を示すことから、メラトニンリズムの調節には光と生物時計(生物に内在する自律性の計時機構)が深く関与していると考えられている。しかし数種のサケ科魚類では松果体におけるメラトニンリズムが恒暗条件下で消失することから生物時計による調節を欠いていることが知られている。そこで本研究では、松果体のメラトニンリズムが生物時計による調節を欠くニジマスと、生物時計により調節を受けるアユを対象として、メラトニンリズムの調節機構を生理学的、分子生物学的手法を用いて比較解析することを目的とした。

### 1. アユとニジマスの松果体と網膜におけるメラトニンリズムの検討

アユとニジマスの松果体と網膜にメラトニンリズムが存在するか否か、また、それらが光と生物時計によって調節されているか否かを調べた。松果体については灌流培養を行い、培養液中に放出されるメラトニン含量を、網膜については眼球内メラトニン含量をラジオイムノアッセイ(RIA)を用いて測定した。血中メラトニン濃度についても同様に解析した。その結果、アユ松果体からのメラトニン分泌量、眼球内メラトニン含量、および血中メラトニン濃度は明暗条件下では明期に低く暗期に高い日周リズムを示した。恒暗条件下においてもリズムは自由継続し概日リズムを示したが、恒明

条件下では低い値を示し、リズムは消失した。ニジマス松果体からのメラトニン分泌量、眼球内メラトニン含量、および血中メラトニン濃度は明暗条件下でアユ松果体と同様に日周リズムを示したものの、恒暗条件下ではリズムが消失し、高い値を示し続け、一方、恒明条件下では低い値を示しつづけた。以上の結果から、アユのメラトニンリズムは光と生物時計の両者によって調節されるが、ニジマスのメラトニンリズムについては生物時計による調節を欠き、光のみによって制御されることが判明した。これらのことから、アユとニジマスのメラトニン合成機構を比較することにより、光と生物時計によるメラトニンリズムの調節機構の違いを解明できると考えられた。

## 2. アユとニジマスのアシルアルキルアミン *N*-アセチルトランスフェラーゼ (AANAT: EC 2.3.1.87) の cDNA クローニング

メラトニンの合成量は、メラトニン合成酵素の 1 つである AANAT 活性の変動に従うと考えられている。そこでまず、アユ松果体、アユ網膜、およびニジマス網膜から AANAT 遺伝子を、縮重プライマーを用いた RT-PCR 法と rapid amplification of cDNA ends 法によって cDNA クローニングし、塩基配列を決定した。配列解析の結果、アユとニジマスの網膜から得られた AANAT は魚類以外の脊椎動物の AANAT と同じサブファミリー (AANAT1) に属し、アユ松果体から得られた AANAT は魚類に特異的に存在する AANAT サブファミリー (AANAT2) に属することが判明した。時期を同じくして、他の研究グループによってニジマス松果体から AANAT2 の cDNA がクローニングされた。そこでアユとニジマスの AANAT1、AANAT2 の発現部位を RT-PCR 法を用いて調べた。その結果、アユとニジマスの両種において、AANAT1 は網膜には発現するが松果体には発現しないこと、AANAT2 mRNA は松果体に発現するが網膜には発現しないことが判明した。また、心臓、胃、幽門垂、腸、肝臓、脾臓、腎臓、卵巣には両者とも発現していなかった。これらの結果から、魚類には 2 種類の異なる AANAT 遺伝子が存在し、AANAT1 は網膜、AANAT2 は松果体に組織特異的に発現していることが明らかになった。

## 3. アユとニジマスの松果体と網膜における AANAT mRNA の動態

次に、アユ AANAT1、AANAT2、ニジマス AANAT1 の発現が光と生物時計による制御を受けているか否かを明らかにするため、TaqMan プローブを用いた定量 PCR 法によって mRNA の動態を解析した。その結果、アユ網膜の AANAT1、松果体の AANAT2 mRNA 量は明暗、恒暗、恒明の各条件において明期および主観的明期に低く、暗期および主観的暗期に高いリズムを示した。一方、ニジマス網膜の AANAT1 mRNA 量は明暗条件下では明期に低く暗期に高い日周リズムを示したが、恒暗条件下ではリズムが消失し、明暗条件下の暗期よりも高い値を示し続けた。一方、恒明条件下では明暗条件下の明期とほぼ同じ値を示した。以上の結果から、アユ網膜の AANAT1、松果体の AANAT2 の mRNA 量は生物時計によって調節されているのに対し、ニジマス網膜の AANAT1 mRNA 量は光によって調節され、生物時計による調節を受けていないことが明らかとなった。ニジマス松果体の AANAT2 mRNA 量は光条件と時刻に関わらず常に一定で、光と生物時計による調節をいずれも欠いているということが報告されている。これらのことから、

AANAT の転写調節機構は、生物時計によって調節されているアユ網膜・松果体の AANAT1 ・ AANAT2 タイプ、光によって調節されているニジマス網膜の AANAT1 タイプ、および光と生物時計のどちらにも調節されていないニジマス松果体の AANAT2 タイプの合計 3 タイプが存在することが判明した。

#### 4. アユ・ニジマス松果体のメラトニン分泌日周リズムの調節における転写・翻訳の役割

メラトニンリズムの調節に転写と翻訳が関与しているか否かを明らかにするために、RNA 合成阻害剤 (actinomycin D; Act D) とタンパク合成阻害剤 (cycloheximide; CHX) がアユおよびニジマス培養松果体のメラトニン分泌リズムに与える影響を比較検討した。松果体を明暗条件下において通常の培養液中で 24 時間培養した後、さらに 24 時間各阻害剤を含む培養液で培養した。その結果、Act D を投与した場合には、アユ松果体からの暗期のメラトニン分泌は対照群の約 20% に抑制されたが、ニジマスでは約 60% に低下するにとどまった。一方 CHX を投与した場合には、両者とも夜間のメラトニン分泌は対照群の約 2% に低下した。以上の結果から、メラトニンリズムが生物時計による制御を受けているアユ松果体においてはメラトニン分泌リズムの維持に新規の転写およびタンパク合成が関与しているのに対し、生物時計による制御を受けていないニジマス松果体では主にタンパク合成が関与することが明らかになった。これらの結果は、魚類の松果体におけるメラトニンリズムが遺伝子の転写調節段階で生物時計による制御を、翻訳段階で光による制御を受けていることを強く示唆している。

#### 5. アユ松果体のメラトニン分泌概日リズムの生物時計による調節における転写と翻訳の役割

アユ松果体のメラトニン分泌概日リズムを調節する生物時計の発振系において遺伝子の転写と翻訳はどのように関わっているのだろうか？このことを明らかにするため、mRNA 合成阻害剤 5,6-dichloro-1- $\beta$ -D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB)、およびタンパク質合成阻害剤 CHX がアユ松果体のメラトニン分泌概日リズムに与える影響を調べた。恒暗条件下で灌流培養したアユ松果体に対して、8 つの異なる時間帯に 6 時間の薬剤パルス処理を行い、引き続き恒暗条件下で培養した。メラトニン分泌量を指標として生物時計の位相変位を測定した結果、DRB、CHX の両者ともに生物時計の位相を変化させる時間帯があることが判明した。このことからメラトニンリズムを制御する生物時計の駆動には遺伝子の新たな転写と翻訳の双方が必要であることが判明した。DRB、CHX のパルス処理に対して位相変位の感受性が高い時間帯が複数存在したことから、生物時計の駆動には複数の遺伝子の周期的な発現が必要であることが示唆された。

以上、本研究においては、魚類の松果体と網膜におけるメラトニンリズムの光と生物時計による調節機構について、アユとニジマスを対象として比較検討し、いくつかの興味深い知見を得た。本研究で得られた成果は魚類におけるメラトニンリズム研究のみならず、生物時計の発振機構および時刻情報伝達機構の解明にとって重要な基礎的知見となるものと思われる。