

## 論文の内容の要旨

水圏生物科学 専攻

平成 13 年度博士課程 進学

氏 名 増田智浩

指導教官名 會田勝美

論文題目 Extra-retinal photoreceptors in the pineal organ and brain of a teleost, ayu

*Plecoglossus altivelis*

(アユの松果体および脳に存在する非網膜系光受容体に関する研究)

脊椎動物において光は視覚のみならず、生物時計(サーカディアンリズム)、メラトニン分泌、遊泳・摂餌活動リズム、体色変化などの日周リズム変動、性成熟などに見られる光周性の制御にも関わっている。これらの非視覚系機能を制御する光受容組織として哺乳類では網膜が知られているが、その他の脊椎動物では網膜以外に松果体、皮膚および脳がある。一方、これらの非網膜以外の系光受容組織に存在する光受容体の分子種およびそれらの分子が制御する機能に関しては未知の点が多い。そこで本研究ではメラトニン分泌、遊泳活動、さらには性成熟生物活動に光が重要な役割を果たしているアユ (*Plecoglossus altivelis*) を用いて光受容組織とそこに存在する光受容体の分子種を明らかにし、それらの制御する機能を調べた。特にアユは生殖腺発達に明確な光周性が見られることから、魚類において未知の性成熟制御に関与する光受容部位および光受容体の解明をする上で最適な魚種である。

### I. 網膜以外の非視覚系光受容組織の検討

魚類において非網膜以外系の光受容能を持つ組織としては、これまでに松果体、皮膚および脳が魚類において知られている。しかし皮膚と脳に関しては一部の魚種において光受容能を持つ体が存在することが知られているのみである。そこでまず第一部として、これらの組織に焦点を当て、アユが網膜以外にどの組織で光を受容するのか調べた。光受容体としてをオプシンが関与するのではないかと考え、オプシン遺伝子に対する-cDNA クローニングを試みにより

調べた。その結果、松果体からではエクソロドプシンと、赤色光感受性オプシン、紫外光感受性オプシンの3種、の2種、脳からではロドプシンに対して相同性の高い cDNA 部分配列が得られた。一方、皮膚からにおいてはオプシン様の cDNA はクローニングされなかった。これらのことから、アユでは網膜の他に、松果体と脳においてオプシンファミリーの光受容体を持つことが示唆された。

## II. 松果体

松果体から分泌されるメラトニンは明期に低く暗期に高い日周変動を示し、明暗情報や日周変動の伝達を司ると考えられている重要なホルモンである。光は暗期におけるメラトニン分泌量の上昇を抑制し、メラトニン分泌リズムを明暗リズムサイクルに同調させる。また、一般にメラトニン分泌リズムの制御には生物時計も関与しており、光はメラトニン分泌リズムを直接的に、また生物時計を介し間接的に制御していると考えられている。さらに魚類では、松果体から脳内に神経が投射しており、脳内への光情報の直接的な伝達経路の存在も示唆されている。従って、松果体には複数の光情報伝達経路を持つが存在すると考えられる。しかしながらこれらの経路に関与する光受容体は同定されていない。前節第一部において、松果体には23種のオプシン遺伝子の発現が示唆された。そこで本項研究では、特に光情報の伝達因子で様々な生理現象の制御に関与していると考えられているメラトニン分泌制御に関わる松果体の光受容体を同定することを試み目的とした。その端緒としてアユ松果体を用い、暗期のメラトニン分泌抑制に関わる光受容体の同定を目指した。岡崎国立共同研究機構基礎生物学研究所の大型スペクトログラフ室において、光強度の異なる様々な波長の単色光をアユの培養松果体に照射し、メラトニン分泌の抑制における対する波長特異性を調べた。その結果、400 nm から 700 nm まで 100 nm 間隔の単色光全てにおいて、光強度依存的にメラトニン分泌が抑制された。さらに詳細に検討するため、350 nm から 700 nm まで 25 nm 毎に異なる光強度の単色光をアユの培養松果体に照射したところ、0.01 nmol photon/m<sup>2</sup>s の光強度では 525 nm の単色光に対し、メラトニン分泌は最も強く抑制のピークが確認された。しかし、0.1、さらには 1 nmol photon/m<sup>2</sup>s と光強度が増加するにつれ、500 nm と 575 nm より短波長 (0.1 nmol photon/m<sup>2</sup>s 毎 nm<sup>2</sup>) および長波、475 と 525-550 nm 長側 (1 nmol photon/m<sup>2</sup>s 毎 nm<sup>2</sup>) の光に対する二相性の強い抑制も強い強い抑制が見られるようになった。これらのことから、メラトニン分泌抑制には複数の光受容体に関与していることが示唆された。抑制に関与する光受容体を同定するため、前節第一部で得られた結果をもとに松果体で発現しているオプシン遺伝子 cDNA 全長の塩基配列を決定を試みた。その結果、エクソロドプシンと赤色光感受性オプシン遺伝子の塩基配列決定に成功したが発現していることが示された。また、赤色光感受性オプシンの cDNA 塩基配列は網膜のそれと同一であった。さらにアユの網膜において発現しているオプシンの塩基配列をもとにオプシンの cDNA クローニングを行ったところ、紫外光感受性オプシンおよび緑色光感受性オプシン様の cDNA 部分塩基配列が得られ決定された。これらを含めた 34 種のオプシンがに關して松果体において発現していることをは Reverse Transcriptase (RT)-PCR により確認した。一般

~~にロドプシンの光感受性は緑色光感受性オプシンより高いことから、以上の実験結果から、松果体におけるメラトニン分泌抑制にはエクソロドプシン、赤色光感受性オプシン、紫外光感受性オプシンの 3 種全てのオプシンが関与していることが考えられた。今後はこれらの光受容体の波長特異性を確認することが必要であると考えられる。また、これらの光受容体がメラトニン分泌抑制以外の光情報伝達経路に関わるのか、それとも他の光受容体が存在するのかという課題が残された。~~

## II. 脳

### 1. 眼球、松果体以外の未知光受容体の生殖腺発達への関与の証明

アユにおいて魚類の既知の光受容部位である眼球および松果体を摘出し、長日条件下で飼育すると性成熟が抑制されることから、未知の光受容部位の存在が示唆されていた。~~しかし以上の結果のみでは、成熟抑制が手術による影響なのか、光による影響なのかが不明確である。~~そこでアユにおいて未知光受容部位が生殖腺発達の制御に関与することの再確認証明を試みた。アユの眼球および松果体を摘出し、明期 20 時間、暗期 4 時間の長日条件 (LD20:4, 19 °C) で一週間飼育した。その後、短日処理群 (LD4:20, 19 °C) と長日処理群 (同上) の 2 群に分けて 3 週間飼育し、生殖腺の発達具合を比較した。その結果、雌雄共に短日処理群の~~では~~生殖腺体重比は~~が~~長日処理群と比較して有意に~~な~~増加~~し~~が確認された。雄において~~雄性ステロイドである~~テストステロン (T) ~~および~~ 11-ケトテストステロン (11-KT) の血中濃度を測定したところ、T, 11-KT ~~とも~~共に短日処理群で長日処理群と比較して有意に~~高い値を示~~増加~~し~~が確認された。また、雌において ~~T および~~雌性ホルモンであるエストラジオール-17β (E<sub>2</sub>) ~~およびその前駆物質である T の~~血中濃度を測定したところ結果、T, E<sub>2</sub> ~~とも~~共に短日処理群で長日処理群と比較して有意に~~高い値を示~~増加した。また、精巣および卵巣の組織切片を作成し、生殖腺の発達段階を確認したところ、精巣では短日処理群において精原細胞が盛んに増殖分裂し、多数の精原細胞および精母細胞が確認されたのに対し、長日処理群では精原細胞の増殖分裂がほとんど確認できなかった。一方、卵巣では短日処理群において卵の成熟段階が最終成熟まで進行していたのに対し、長日処理群では実験開始時と変わらず、~~主に~~周辺仁期の卵が~~主に~~観察された。従って、眼球および松果体を摘出しても日長の短日化により生殖腺発達が促進され、長日条件下において抑制されることから、アユにおいては~~は~~眼球・松果体以外の未知の光受容部位が生殖腺発達の制御に関与していることが明らかとなった。また、~~オプシン遺伝子が脳から~~第一部 cDNA クローニングされたの結果を考えあわせるとから、脳内に存在する未知の光受容体が性成熟に関与している可能性が~~こと~~高いと考えられるが示唆された。

### 2. 脳内ロドプシン遺伝子の発現確認

~~第一部からアユ脳内にロドプシン様遺伝子の発現が示唆された。本章では脳内光受容体の同定のため、脳から得られたロドプシン様 cDNA 塩基配列をもとに、DNA 全長の塩基配列を決定~~

した。その結果、網膜に発現するロドプシン cDNA と同一の塩基配列であることが判明した。さらにノーザンブロットおよびサザンブロット解析により、脳内に網膜と同一のロドプシン遺伝子が発現していることが示唆された。また、RT-PCR により、終脳および間脳においてロドプシン遺伝子の発現が確認された。また、性成熟制御に関与する視索前野は終脳と間脳の境界部に存在することから、脳内に発現するロドプシンが性成熟制御に関与していることが考えられた。

### 3. 脳内ロドプシンの存在部位の同定

脳内でのロドプシンの存在部位を明らかにするためにロドプシンの演繹アミノ酸配列をもとに抗体を作製した。得られた抗血清の特異性を確認するために脳と同一のロドプシンが発現している網膜を用いてウエスタンブロットティングに供した結果、ロドプシンの演繹アミノ酸配列から推定される分子量に相当すると同一の 42kDa のシングルバンドのみが検出され得られた。さらに、網膜において免疫組織化学を行ったところ、桿体の外節にから免疫陽性反応が観察された。以上のことから、得られた抗血清はロドプシン特異的であると判定されられた。この抗血清を用い、アユの脳で免疫組織化学を行った。そのところ結果、視索前野の大細胞部および小細胞部の神経核においてロドプシンに対する免疫陽性反応が観察された。これらの神経核は生殖腺発達制御の中核を担う重要な神経細胞の存在部位であることから、ロドプシンの性成熟制御への関与が示唆された。また、視索前野それ以外にも、嗅球の嗅索、終脳の腹側野背側部、腹側野腹側部、腹側野交連上部、腹側野交連後部、間脳の視交差上核、視床腹内側核、nucleus recessi lateralis、中脳の縦走堤、さらには延髄の縫線核、青斑核、網様体の神経核でも免疫陽性反応が見られた。これらの結果から、アユの脳内光受容体は性成熟制御のみならず、体色変化や活動リズムなど様々な機能を制御していることが考えられた。しかし、脳内ロドプシンが制御する具体的な機能に関しては今後の課題として残された。

以上本の研究においてはよって、アユをモデルとして魚類における松果体と脳における光受容体に関して検討を行った。その結果、非網膜以外に発現する系光受容体の分子種およびそれらの制御する生理機能機構の一端が明らかになった。松果体においては、メラトニン分泌制御に複数の光受容体に関与していることが示唆された。また、脳内光受容体は成熟制御をはじめとする以外にも複数の生理機能を制御していることが示唆された。本研究で得られた研究成果をもとに、魚類の生理機能今後、より詳細な研究が行われることにより、生物活動の光による制御機構メカニズムの詳細が明らかにされることがと期待される。