

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 増田 智浩

光は日周リズムや光周性の制御に関わっている。これら機能を制御する光受容組織として哺乳類以外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、これら網膜外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。本研究は、メラトニン分泌、遊泳活動、さらには性成熟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推察したものである。その大要は以下のとおりである。

I. 網膜以外の光受容組織の検討

まず、アユの松果体、皮膚および脳に焦点を当て、オプシン遺伝子の cDNA クローニングを試みた。その結果、松果体からエクソロドプシンと赤色光感受性オプシンの 2 種、脳から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。従って、アユでは松果体と脳においてオプシンが光受容体であることが示唆された。

II. 松果体

光は松果体におけるメラトニン分泌を制御しているが、メラトニン分泌を制御する光受容体は未知である。そこでメラトニン分泌制御に関わる光受容体の同定を試みた。アユの培養松果体に 350 nm から 700 nm まで 25 nm 毎の単色光をアユの培養松果体に照射した。その結果、0.01 nmol photon/m²s 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され、525 nm に吸収極大を持つオプシンの Dartnall のノモグラムとよく一致した。しかし、0.1 さらには 1 nmol photon/m²s と光強度が増加すると、525 nm より短波長側 (350-525 nm) と長波長側 (525-700 nm) の光に対するメラトニン抑制効果が増し、Dartnall のノモグラム一致しなくなった。これらのことから、メラトニン分泌制御には複数の光受容体が関与していることが示唆された。

次に松果体で発現しているオプシン遺伝子 cDNA の塩基配列を決定した。その結果、エクソロドプシン、赤色光感受性オプシン、緑色光感受性オプシン、紫外光感受性オプシンの遺伝子が発現していることが示された。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、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 種が関与していることが考えられた。

III. 脳

眼球、松果体以外の未知光受容体の生殖腺発達への関与： アユにおいて既知の光受容

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。そこで短日化によりアユの生殖腺が発達するか否かを調べた。その結果、眼球+松果体摘出群と未手術群の雌雄共に短日処理群の生殖腺体重比は長日処理群に比較して有意に増加した。雄では血中のテストステロン (T) および 11-ケトテストステロンの濃度は短日処理群で長日処理群と比較して有意に高い値を示した。また、雌の T およびエストラジオール-17βも同様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した。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のみ精原細胞の盛んな増殖分裂が確認された。卵巣でも同様に短日処理群において卵の成熟が顕著に進行していた。以上の結果から、未知の光受容部位が生殖腺発達を制御していることが明らかとなった。第一章の結果から、脳内に存在するロドプシンが性成熟に関与していると考えられた。

脳内ロドプシン遺伝子の発現確認： 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 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。

脳内ロドプシンの存在部位の同定： 脳内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。抗血清の特異性を確認した後、アユの脳で免疫組織化学を行ったところ、視索前野の大細胞部および小細胞部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枢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、延髄の縫線核、青斑核、網様体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。

以上、本研究は、アユにおいて網膜以外に松果体と脳が光受容組織として働いていること、とくに脳が直接光を受容し性成熟を調節している可能性、をロドプシン遺伝子の発現を指標に示したもので、学術上、応用上寄与するところが多い。よって審査委員一同は、本論文が博士(農学)の学位に値するものと判断した。