月周同調産卵リズムをもったクサフグの間脳における 4つのメラトニン受容体サブタイプ遺伝子の同期的な日周 および概日発現

池 上 太 郎 (九州大・院農・動物資源科学)

E-mail: t-ikegami@brs.kyushu-u.ac.jp

1. はじめに

メラトニンは概日リズムや季節的なリズムの調節に関わる神経ホルモンである^{1,2)}。最近、月齢同調産卵魚であるアイゴにおいて、メラトニンが月周リズムの形成にも関わる可能性が報告された³⁾。クサフグは新月と満月の日に産卵をする月齢同調産卵魚である⁴⁾。我々は、月周リズム形成機構を解明するため、クサフグを実験モデルとして、メラトニンの作用機構に着目して研究を行っている。メラトニンの作用は、Gタンパク質共役型受容体であるメラトニン受容体を介して伝えられる⁵⁾。魚類では、メラトニン受容体は、Mel_{1a}1.4、Mel_{1a}1.7、Mel_{1b}およびMel_{1c}の4つのサブタイプがある^{6~8)}。最近、我々はキンギョの視蓋と網膜において、4つのサブタイプ遺伝子の発現が日周変動することを明らかにした⁸⁾。メラトニン受容体遺伝子の日周発現は、メラトニン作用に重要であると考えられるが、この調節機構についてはわかっていない。アイゴでは、メラトニン受容体遺伝子の発現は概日変動し、さらに光によって発現が抑制されることが報告されている^{9~11)}。このことから、メラトニン受容体遺伝子の日周発現は、概日時計と光によって調節されていると考えられる。本研究では、クサフグの4つのメラトニン受容体サブタイプ遺伝子をクローニングし、中枢から末梢組織までの発現組織を同定した。さらに網膜、間脳、視蓋におけるメラトニン受容体遺伝子が日周および概日発現するのかを調べた。

2. クサフグのメラトニン受容体遺伝子の発

現組織の同定

クサフグの近縁種であるトラフグのゲノム情報 (<http://www.fugu-sg.org/>) を検索し、その遺伝子配列に基にプライマーを設計し、間脳cDNAを鋳型にして、クサフグの4つのサブタイプ遺伝子 (Mel_{1a}1.4、Mel_{1a}1.7、Mel_{1b}、Mel_{1c}) をクローニングした。

つづいて、RT-PCR法を用いてメラトニン受容体遺伝子の発現組織を同定した。その結果、4つのサブタイプは脳の全ての領域で発現しており、特に、視覚情報処理に関わる終脳、間脳、視蓋で発現量が高かった (図1)。また網膜や下垂体においても4つのサブタイプは強く発現していた。一方、末梢組織では、Mel_{1a}1.4、Mel_{1a}1.7およびMel_{1b}はほとんどの組織で発現していたが、Mel_{1c}は腎臓、脾臓、精巣でのみで非常に弱く発現していた。これらの結果から、クサフグの4つのメラトニン受容体サブタイプは視覚情報の処理に重要な働きをもつことが示唆された。

3. クサフグのメラトニン受容体遺伝子の日周および概日発現

4つのサブタイプは、網膜、間脳、視蓋で強く発現していたことから、これらの組織における遺伝子発現の日周および概日変動を調べた。

網膜では、4つのサブタイプは日周および概日変動していた。明暗条件下では、Mel_{1a}1.7、Mel_{1b}およびMel_{1c}が主に発現していた。恒暗条件下にすると、これらの発現パターンは維持されたが、発現量は大きく減少した。このことから、網膜では、Mel_{1a}1.7、

図1 クサフグの4つのメラトニン受容体サブタイプ遺伝子の発現組織分布
Mel_{1a}1.4、Mel_{1a}1.7およびMel_{1b}は中枢神経系から末梢組織まで広く発現していたが、Mel_{1c}は主に中枢神経系で発現していた。

Mel_{1b}およびMel_{1c}が主に発現しており、これらの遺伝子の発現は光と概日時計によって調節されることが示唆された。

間脳では、4つのサブタイプは同調した日周および概日変動を示した(図2)。明暗条件下では、ZT15時にピークをもっていた。恒暗条件下にすると、ピークはCT18時にシフトし、発現量は大きく上昇した。これは網膜と全く逆の結果であった。これらのことから、クサフグの間脳ではメラトニン受容体の発現を概日時計によって調節されており、光によって発現が抑制されたと考えられる。メラトニンが月周同調産卵のシグナルとして働くことがアイゴで示唆されていることから³⁾、間脳におけるメラトニン受容体の役割は、月齢情報を生殖中枢に伝達する役割ではないかと推測される。今後、メラトニン受容体サブタイプが間脳のどのニューロンに発現しているのか明らかにする必要がある。

視蓋では、4つのサブタイプは日周および概日変動していた。明暗条件下では、4つのサブタイプは暗期にピークをもっていた。恒暗条件下にすると、変動パターンはサブタイプごとに異なっていた。このことから、視蓋におけるメラトニンの作用はサブタイプごとに異なっていると考えられる。

図2 間脳における4つのメラトニン受容体サブタイプ遺伝子の発現の日周変動および概日変動
明暗および恒暗条件下において、4つのサブタイプ遺伝子の発現は同期していた。4つのサブタイプの発現量は、明暗条件に比べ恒暗条件下で有意に高かった。

4. まとめ

クサフグの4つのメラトニン受容体サブタイプは脳の全ての領域で発現しており、特に、視覚情報処理に関わる脳の領域である終脳、間脳および視蓋と網膜で発現量が高かった。網膜、間脳および視蓋では、4つのサブタイプ遺伝子の発現は日周および概日変動していた。特に間脳では4つのサブタイプの発現が同期していた。クサフグの月周同調産卵リズムの調節に間脳のメラトニン受容体が関わっているのかもしれない。

本論文は、Synchronized diurnal and circadian expressions of four subtypes of melatonin receptor genes in the diencephalon of a puffer fish with lunar-related spawning cycles (Ikegami T, Motohashi E, Doi H, Hattori A, Ando H)と題し、Neuroscience Letters, (2009) **462**, 58-63に発表した。

文 献

- 1) Falcón J, Besseau L, Sauzet S, Boeuf G, 2007. Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. Trends Endocrinol Metab, **18**, 81-88.
- 2) Reiter RJ, 1993. The melatonin rhythm: both a clock and a calendar. Experientia, **49**, 654-664.
- 3) Takemura A, Susilo ES, Rahman MD, Morita M, 2004. Perception and possible utilization of moonlight intensity for reproductive activities in a lunar-synchronized spawner, the golden rabbitfish, J Exp Zool, **301A**, 844-851.
- 4) Yamahira K, 2004. How do multiple environmental cycles in combination determine reproductive timing in marine organisms?, A model and test, Funct Ecol **18**, 4-15.
- 5) Reppert SM, Weaver DR, Godson C, 1996. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. Trends Pharmacol Sci, **17**, 100-102.
- 6) Reppert SM, Weaver DR, Cassone VM, Godson C, Kolakowski LF Jr, 1995. Melatonin receptors are for the birds: molecular analysis of two receptor subtypes differentially expressed in chick brain. Neuron, **15**, 1003-1015.
- 7) Mazurais D, Brierley I, Anglade I, Drew J, Randall C, Bromage N, Michel D, Kah O, Williams LM, 1999. Central melatonin receptors in the rainbow trout: comparative distribution of ligand binding and gene expression, J Comp Neurol, **409**, 313-324.
- 8) 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.
- 9) Park YJ, Park JG, Hiyakawa N, Lee YD, Kim SJ, Takemura A, 2007. Diurnal and circadian regulation of a melatonin receptor, MT1, in the golden rabbitfish, Siganus guttatus, Gen Comp Endocrinol, **150**, 253-262.
- 10) Park YJ, Park JG, Jeong HB, Takeuchi Y, Kim SJ, Lee YD, Takemura A, 2007. Expression of the melatonin receptor Mel1c in neural tissues of the reef fish Siganus guttatus, Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol, **147**, 103-111.
- 11) Park YJ, Park JG, Kim SJ, Lee YD, Rahman MS, Takemura A, 2006. Melatonin receptor of a reef fish with lunar-related rhythmicity: cloning and daily variations, J Pineal Res, **41**, 166-174.