本研究から、クサフグは水槽内で半月周期性産卵リズムを維持することが分かり、そのリズムの分子制御機構を水槽内で実験的に解析できることが確かめられた。また、産卵回遊の回帰性が高いことも分かっており、フィールドにおいて制御因子の機能解析も可能である。クサフグは月周同調産卵リズムの分子機構を解明するための優れた動物モデルである。

本論文は、Aggregating behavior of the grass puffer, *Takifugu niphobles*, observed in aquarium during the spawning period (Motohashi E, Yoshihara T, Doi H, Ando H)と題して、Zoological Science (2010) 27, 559-564に発表した。

文 献

- 1) Takemura A, Rahman MS, Nakamura S, Park YJ, Takano K, 2004. Lunar cycles and reproductive activity in reef fishes with particular attention to rabbitfishes. Fish Fisheries, **5**, 317-328.
- 2) Hsiao SM, Meier AH, 1989. Comparison of semilunar cycles of spawning activity in *Fundulus grandis* and *F. heteroclitus* held under constant laboratory conditions. J Exp Zool, **252**, 213-218.
- 3) Nozaki M, Tsutsumi T, Kobayashi H, Takei Y, Ichikawa T, Tsuneki K, Miyagawa K, Uemura H, Tatsumi Y, 1976. Spawning habit of the puffer, *Fugu niphobles* (Jordan et Snyder) I. Zool Mag (Tokyo), **85**, 156-168.
- 4) Kobayashi Y, Kobayashi H, Takei Y, Nozaki M, 1978. Spawning habit of the puffer, *Fugu niphobles* (Jordan et Snyder) II. Zool Mag (Tokyo), **87**, 44-55.
- 5) Honma Y, Ozawa T, Chiba A, 1980. Maturation and spawning behavior of the puffer, *Fugu niphobles*, occurring on the coast of Sado Island in the Sea of Japan (a preliminary report). Japan J Ichthyol, **27**, 129-138.
- 1) Takemura A, Rahman MS, Nakamura S, Park YJ, Takano K, 2004. Lunar cycles and reproductive activity in reef fishes with particular

マツカワの黒色素胞および黄色素胞におけるメラノコルチン受容体の異なる発現様式

小 林 勇 喜 (北里大・海洋生命)

E-mail: roko56_56@yahoo.co.jp

1. はじめに

硬骨魚類における色素胞内の色素凝集および拡散による体色変化は、内分泌系および神経系により制御される^{1, 2)}。脳下垂体で産生される黒色素胞刺激ホルモン (MSH) は、メラノコルチン受容体 (MCR) を介して、色素拡散による体色の暗化に関与する³⁾。MSH はプロオピオメラノコルチン (POMC) から副腎皮質刺激ホルモンおよびβ-エンドルフィンと共に、翻訳後プロセッシングにより生じる^{4, 5)}。北日本の太平洋沿岸に生息する大型のカレイ目であるマツカワ (*Veraspermoseri*) には3種のPOMCサブタイプ (A, B, C型) が存在し、A, B型は脳下垂体で主に発

現するが、C型は脳下垂体のみならず皮膚でも顕著に発現する⁶⁾。さらに、皮膚において、C型は色素胞以外の細胞で発現すること⁷⁾、C型に由来するDes-Ac-α-MSHが産生されることを明らかにした⁸⁾。これらの結果は皮膚で産生されたDes-Ac-α-MSHが、傍分泌的に皮膚色素胞の拡散に関与する可能性を示唆する。また、MSH類を用いた皮膚片の培養実験により、アミノ末端部のアセチル化が黄色素胞では色素拡散能を促進するが、黒色素胞では色素拡散能を抑制することを見出した⁷⁾。この反応の違いは2種の色素細胞におけるMCRサブタイプの発現の違いに起因すると考えられた。そこで、本研究ではマツカ

ワにおいて未同定であるMCRサブタイプをクローニングし、各組織における発現を調べると共に、皮膚色素胞におけるMCR遺伝子の発現を精査することを目的とした。

2. MC1RおよびMC5RのcDNAクローニング

マツカワ脳由来cDNAを鋳型とした各PCR法により、MC1RおよびMC5Rの全翻訳領域をクローニングした。これにより、同定済みであるMC2RおよびMC4R⁹⁾と合わせてマツカワに少なくとも4種類のMCRサブタイプが存在することを明らかにした。一方、ゲノムデータベースが構築されているフグにおいて報告のないMC3Rが、マツカワに存在するか否かは現在のところ不明である。

3. MC1RおよびMC5Rの発現組織分布の解明

マツカワの18組織から抽出した全RNAを鋳型としてRT-PCRを行い、各組織におけるMC1RおよびMC5Rの発現を調べた。その結果、両遺伝子共に様々な組織で発現することを認めた。中でもMC1Rの顕著な発現は、脳、眼球、精巣、有眼側皮膚、無眼側皮膚において認められた。MC5Rの顕著な発現は、脳、精巣、有眼側皮膚において認められた。この結果はマツカワにおいてMSHが、古典的作用に加えて様々な生理機能に関与することを示唆する。

4. 単離した色素細胞におけるMC1RとMC5Rの発現

コラゲナーゼを用いて鰭の皮膚から黒色素胞、黄色素胞、および色素胞以外の細胞を分離した(図1)。顕微鏡下でガラスキャピラリーを用いて細胞を1個ずつ回収し、これらから調製したcDNAを鋳型としてシングルセルPCRを行い、皮膚におけるMCR発現細胞を調べた。その結果、マツカワの黒色素胞ではMC1RとMC5Rが、黄色素胞ではMC5Rのみが発現することを明らかにした。一方、色素胞以外の細胞群ではMCRの発現は認めら

図1 色素胞の単離
各写真のバーは100μmを表す。

れなかった。以上の結果および、色素胞以外の細胞でPOMC-Cが発現すること⁷⁾を考慮すると、マツカワの皮膚で産生されるDes-Ac- α -MSHはMC1RおよびMC5Rを介して、傍分泌的に各色素胞に作用すると考えられる(図2)。

一方、これまでの研究により、MSHに対するアセチル化が黄色素胞の色素拡能を促進すること、および黒色素胞の色素拡散を抑制することを報告した。黄色素胞ではMC5Rが単独で発現するのに対し、黒色素胞ではMC5Rに加えてMC1Rも発現することを考慮すると、色素胞において発現するMCRの種類および数がリガンドとの親和性に関与する可能性が考えられる。MCRが属するGタンパク質共役受容体(GPCR)間ではヘテロダイマーが生じ、その結果としてリガンド結合能の変化、シグナル伝達の変化、細胞内移動の変化等が起こることが示されている¹⁰⁾。このことから、マツカワMCRにおいてもヘテロダイマーが生じ、複数存在するリガンドとの複雑かつ巧妙な親和性が生じている可能性が考えられる(図2)。

5. まとめ

以上を要約すると、皮膚で産生されるMSHはMC1RおよびMC5Rを介して色素胞

図2 マツカワにおける体色調節

シングルセルPCRの結果からマツカワにおける体色調節に対するMSHの作用機構を推測した。

に傍分泌的に作用すると推測される。即ち、MSHは脳下垂体を起点とする内分泌系と皮膚内の傍分泌系により、体色調節に関与していると考えられる。また、これまでの研究によりMSHに対するアセチル基の有無が、黒色素胞と黄色素胞で異なる色素拡散作用を示すことを報告した。本研究により明らかにした各色素胞におけるMCRの発現の違いおよび、GPCR間においてダイマー形成が生じることを考慮すると、マツカワの皮膚においてMCRがヘテロダイマーを形成し、リガンドとの複雑な親和性が生じている可能性がある。

本論文は、Differential expressions of melanocortin receptor subtypes in melanophores and xanthophores of barfin flounder. (Kobayashi Y, Tsuchiya K, Yamanome T, Schiöth HB, Takahashi A)と題し、Gen Comp Endocrinol, (2010) **168**, 133-142に発表した。

文 献

- 1) Fujii R, 2000. The regulation of motile activity in fish chromatophores. Pigment Cell Res. **13**, 300-319.
- 2) Fujii R, Oshima N, 1986. Control of chromatophore movements in teleost fishes. Zool. Sci. **3**, 13-47.
- 3) Castrucci A.M, Hadley M.E, Wilkes B.C, Hruby V.J, Sawyer T.K, 1989. Melanotropin structure-activity studies on melanocytes of the teleost fish, *Synbranchus marmoratus*. Gen. Comp. Endocrinol. **74**, 209-214.
- 4) Kobayashi Y, Sakamoto T, Iguchi K, Imai Y, Hoshino M, Lance VA, Kawauchi H, Takahashi A, 2007. cDNA cloning of proopiomelanocortin (POMC) and mass spectrometric identification of POMC-derived peptides from snake and alligator pituitaries. Gen Comp Endocrinol, **152**, 73-81.
- 5) Takahashi A, Kawauchi H, 2006. Diverse structures and functions of melanocortin, endorphin and melanin-concentrating hormone in fish. In: Zaccane, G., Reinecke, M., Kapoor, B.G. (Eds.), Fish Endocrinology, Science Publishers, Enfield, 325-392.
- 6) Takahashi A, Kawauchi H, Amano M, Itoh T, Yasuda A, Yamamori K, Amemiya Y, Sasaki K, Yamamori K, 2005. Nucleotide sequence and expression of three subtypes of proopiomelanocortin mRNA in barfin flounder. Gen Comp Endocrinol, **141**, 291-303.
- 7) Kobayashi Y, Mizusawa K, Yamanome T, Chiba H, Takahashi A, 2009. Possible paracrine function of α -melanocyte-stimulating hormone and inhibition of its melanin-dispersing activity by N-terminal acetylation in the skin of the barfin flounder, *Verasper moseri*. Gen Comp Endocrinol, **161**, 419-424.
- 8) Takahashi A, Amano M, Amiya N, Yamanome T, Yamamori K, Kawauchi H, 2006. Expression of three proopiomelanocortin subtype

- genes and mass spectrometric identification of POMC-derived peptides in pars distalis and pars intermedia of barfin flounder pituitary. *Gen Comp Endocrinol*, **145**, 280-286.
- 9) Kobayashi Y, Tsuchiya K, Yamanome T, Schiöth H.B, Kawauchi H, Takahashi A, 2008. Food deprivation increases the expression of melanocortin-4 receptor in the liver of barfin flounder, *Verasper moseri*. *Gen. Comp. Endocrinol*, **155**, 280-287.
- 10) Angers S, Salahpour A, Bouvier M, 2002. Dimerization: an emerging concept for G protein-coupled receptor ontogeny and function. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **42**, 409-439.

キンギョ視床下部における α -黒色素胞刺激ホルモン含有ニューロンと神経ペプチドY含有ニューロンの神経相関

松 田 恒 平 (富山大・院理工・生体制御)
E-mail: kmatsuda@sci.u-toyama.ac.jp

1. はじめに

キンギョは、摂食行動に及ぼす神経ペプチドの影響を調べるためのモデル動物として広く使用されてきた^{1~3)}。多くの神経ペプチドはキンギョとラット・マウスにおいて、類似した摂食作用を発揮する^{3, 4)}。例えば、キンギョにおいて、摂食量は α -黒色素胞刺激ホルモン(α -MSH)の脳室内投与により減少し^{5, 6)}、一方、神経ペプチドY(NPY)の投与により増加する^{7~9)}。哺乳類等における α -MSHによる摂食抑制作用とNPYによる摂食亢進作用の機能的関係に関する知見に比べ^{10~15)}、キンギョにおいて神経ペプチドによる摂食行動の制御と最適化については不明な点が多い^{16, 17)}。そこで、本研究では、視床下部に存在する α -MSH含有ニューロンとNPY含有ニューロンの神経相関の有無について探った。また、視床下部のNPY mRNA量に及ぼすメラノコルチン4型受容体アゴニストであるメラノタンIIの脳室内投与の影響と、視床下部のPOMC mRNA量に及ぼすNPYの脳室内投与の影響をそれぞれ探った。

2. キンギョ脳における α -MSH様免疫陽性反応とNPY様免疫陽性反応の分布

キンギョ脳における α -MSH様免疫陽性

反応とNPY様免疫陽性反応の分布を調べた。業者より購入したキンギョ(体重3~10g、雌雄混合)は、購入後2週間飼育した(12L/12Dの明暗条件、水温20~24℃及び隔日正午の給餌条件で飼育)。キンギョを麻酔下にて断頭し、脳を得た。脳はブアン液にて固定後、定法に従って厚さ8マイクロメートルのパラフィン連続切片にした。連続切片は交互に2つに分けて、脱パラフィン後、一方をヒツジ抗 α -MSH抗血清にて、他方をウサギ抗NPY抗血清にて、それぞれABC免疫染色を施した。間脳領域の免疫染色性を観察したところ、 α -MSH様免疫活性は、間脳に広く分布し、 α -MSH様免疫活性を示す神経細胞体は、視床下部外側隆起核内側(NLTi)に局在していた。また、 α -MSH様免疫活性を示す神経線維は、視床下部脳室周囲後核(NPPv)の周辺に散在していた。一方、他魚種の報告¹⁸⁾と同様に、NPY様免疫活性も間脳領域に広く分布しており、NPY様免疫活性を示す神経細胞体はNPPvに、NPY様免疫活性を示す神経線維はNLTiにそれぞれ存在していた。これらの観察より、 α -MSH含有ニューロンとNPY含有ニューロンは神経相関する可能性が考えられた。そこで、間脳領域における、これらの免疫活性を共焦点レー