受賞者総説

魚類の日周リズムの形成機構に関する研究*1

(平成 10 年度日本水産学会奨励賞受賞)

飯 郷 雅 之*2

聖マリアンナ医科大学解剖学

魚類の多くの生理的活動は、様々な周期性を示すことが知られている。¹⁻⁶⁾ そうした周期性の中で最も顕著なものは1日を周期とする日周リズムである。このようなリズムは、遊泳活動、摂餌活動、生殖活動、酸素消費量、あるいはホルモン分泌などにも観察される。これらの周期性は、環境における物理的要因、化学的要因、あるいは生物的要因の周期的変化によって作り出されていると考えられてきた。しかしながら、近年の研究により内的要因、すなわち生物時計と呼ばれる生体内計時機構がこれらの周期性の発現に重要な役割を果たしていることが明らかになってきた(図1)。しかし、魚類の生物時計の局在と日周リズムの発現・制御機構に関する知見は少ない。そこで、筆者は魚類における日周リズムの形成機構について検討を行ってきた。本稿においてはその成果を概説する。

1. 各種魚類におけるメラトニンの日周リズム

メラトニンはトリプトファンから生合成される *N*-acetyl-5-methoxytryptamine の構造を持ったインドール化合物である。^{7,8)} 多くの脊椎動物のメラトニン合成は、明暗条件下においては暗期に亢進、明期に低下し、松果体はこのメラトニンの日周リズムを介して、自発運動、摂餌活動などの日周リズムや繁殖期決定などの年周リズムの制御に関わっている。⁸⁾ 一方、魚類のメラトニンの動態についてはニジマスとコイで報告されていたものの、⁴⁾ 海産魚については報告がなかった。そこで筆者はまず各種魚類のメラトニンの日周リズムについて検討した。その結果、キンギョ、ウグイ、オイカワ、ナマズなどの淡水魚やヒラメ、マダイ、ブリ、カンパチ、ヨーロッパスズキなどの海産魚、ヒメマス、サクラマスなどの回遊魚における血中メラトニン濃度は暗期に高く、明期に低い日周リズムを示すことがわかった。⁹⁻¹¹⁾ 同様の日周リズムはキンギョの松果体内メラトニン含量と、キ

図1 魚類の日周リズムの形成機構。

ンギョ、オイカワ、ウグイ等の眼球内メラトニン含量にも認められた。¹²⁻¹⁴⁾ メラトニン合成酵素であるアリルアルキルアミン *N*-アセチルトランスフェラーゼとヒドロキシインドール-*O*-メチルトランスフェラーゼが魚類の松果体と網膜には存在するので、^{4,15)} 魚類においてはこれらの器官でメラトニンが合成されているものと結論された。また、松果体除去によりキンギョ血中メラトニン濃度の日周リズムは消失したが、眼球除去は影響を与えなかった。^{9,16)} よって、血中メラトニン濃度の日周リズムは松果体により駆動されていると結論された。

2. 光周期と水温がメラトニンの日周リズムにおよぼす影響

続いて魚類の生理的活動に影響を与える代表的な環境要因である光周期と水温がメラトニンの日周リズムにおよぼす影響について検討を行った。まず、キンギョ、サクラマス、マダイの血中メラトニン濃度におよぼす光周期の影響について検討したところ、血中メラトニン濃度の高値維持時間は短日条件下の方が長日条件下よりも長かった。^{9,16,17)} また、自然条件下で飼育したキンギョにおける血中メラトニン濃度の季節変化を調べたところ、

*1 Regulatory Mechanisms of Daily Rhythms in Fishes.

*2 Masayuki Iigo (Department of Anatomy, St. Marianna University School of Medicine, 2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki 216-8511, Japan).

明期の値は年間を通じて低かったが、暗期においては6月、9月に高く、12月、3月に低い値を示した。これらの変化は水温と有意な相関を示したことから飼育水温を変化させて検討したところ、暗期の血中メラトニン濃度は $5^{\circ}\text{C} < 15^{\circ}\text{C} < 25^{\circ}\text{C}$ の順に高くなった。¹⁷⁾ 水温の影響はマダイでも同様に見られた。よって、環境の光周期と水温の季節変化はメラトニンの日周リズムに変換されて伝達されるものと考えられる。

3. 生物時計によるメラトニンリズムの制御

多くの脊椎動物において、メラトニンの日周リズムは内因性の生物時計による調節も受けており、時間を知る手がかりのない恒常条件下でも約24時間周期のサーカディアンリズムを示すことが知られている。⁸⁾ そこで、魚類においてもメラトニン産生が生物時計により調節されているかどうかを検討した。その結果、キンギョの血中メラトニン濃度、眼球内メラトニン含量は恒暗条件下においても主観的暗期(暗期に相当する時間帯)に高く、主観的明期(明期に相当する時間帯)に低いサーカディアンリズムを示した。しかし、恒明条件下では主観的暗期における上昇は消失し、リズムは失われた。^{13,16)} また、松果体、網膜の単独培養を行っても恒暗条件下でサーカディアンリズムは存続した。^{12,18)} これらの結果からキンギョの松果体と網膜には生物時計が存在し、メラトニンリズムを制御していることが明らかになった。特に松果体は長期にわたってメラトニン分泌のサーカディアンリズムが計測できるので、魚類の生物時計機構を培養条件下で調べるための有用なモデルとなりうる。しかし、サクラマス培養松果体からのメラトニン分泌やオイカワの眼球内メラトニン含量は恒暗条件下では有意な変動を示さず常に高値を示したので、^{14,19)} メラトニン合成系と生物時計との結合の強さは種によって異なっていると思われる。

4. メラトニン受容体の局在と性状

環境の光周期と水温、そして生物時計に制御された日周リズムを示すメラトニンは、体内のどこでどのように作用しているのだろうか? 近年開発された高親和性、高比放射活性のメラトニンアゴニスト2-[¹²⁵I]iodomelatoninによりメラトニン受容体の研究が可能になり、哺乳類や鳥類における局在と性状が明らかにされた。⁸⁾ そこで著者らはこのラジオリガンドを用いて魚類におけるメラトニン受容体の局在と性状について検討した。各種臓器をラジオレセプターアッセイ(RRA)により検索した結果、特異的結合がキンギョの脳、網膜および脾臓に検出された。⁹⁾ 脳と網膜における受容体の性状についてさらに詳しく調べたところ、両者ともに反応

は迅速、安定、可逆的、飽和可能で、メラトニンに対して高い特異性を示した。親和性、密度はそれぞれ脳では $27.2 \pm 1.4 \text{ pM}$, $10.99 \pm 0.36 \text{ fmol/mg protein}$ 、網膜では $61.9 \pm 5.7 \text{ pM}$, $6.52 \pm 0.79 \text{ fmol/mg protein}$ と算出された。^{20,21)} これらの結果からキンギョの脳と網膜には生理的なメラトニン受容体が局在することが明らかになった。また、RRAと*in vitro*オートラジオグラフィーにより、視蓋、視床下部、小脳分子層など脳内に広くメラトニン受容体が分布していることが判明した。同様の脳内分布はナマズでも観察された。²²⁾ これらの結果から、松果体において合成されたメラトニンは血中に放出されてホルモンとして作用するのに対して、網膜において合成されたメラトニンは網膜内でパラクライン的に作用するものと考えられる。

5. メラトニン受容体の制御機構

魚類におけるメラトニン受容体の制御機構についてはこれまでに全く報告がなかった。そこで、著者らはまずキンギョの脳と網膜のメラトニン受容体のGTP感受性を調べた。その結果、GTPとそのアナログはメラトニン受容体の親和性を低下させたので、Gタンパク質連関型の受容体であると考えられた。^{9,23)} さらにキンギョ脳内メラトニン受容体密度が日周性を示すかどうか調べたところ、受容体密度は明暗条件下においては明期に高く、暗期に低い日周リズムを示した。このリズムは血中メラトニン濃度の日周リズムを消失させる松果体除去と恒明条件下での飼育により消失した。これらの結果から、魚類のメラトニン受容体も他のGタンパク質連関型受容体と同様に内因性のリガンドによるダウンレギュレーションを受けることが明らかになった。²⁴⁾

6. メラトニン投与の影響

以上の検討から、メラトニンはメラトニン受容体を介して魚類の日周リズムや年周リズムを制御している可能性が示された。しかし、メラトニン投与が魚類の生理的活動に与える影響についてはこれまで一定の見解が得られていなかった。⁴⁾ その理由の一つとして投与後のメラトニンのパターンが生理的な動態からかけ離れていた可能性が考えられたので、著者らは腹腔内注射および経口によるメラトニン投与法を開発し、メラトニンが一過性に上昇することを確認した。⁹⁾ これらの投与法により実際に魚類の生理機能をメラトニン投与により制御できるか否かを確かめるため、恒明条件下で飼育した雌成熟キンギョに連続7日間メラトニンの定時注射、あるいは定時経口投与を行い、明暗条件下では暗期に同期し恒明条件下で不定期に起こる生殖線刺激ホルモンのサーージと排卵が、特定の時刻に起こるかどうか調べた。しかし、

両投与法ともに雌キンギョの排卵時刻は同期しなかった。続いて、日長の長日化に同期して起こるサクラマス銀化にメラトニンが関与しているかどうかを検討するため、長日条件下で飼育したサクラマスにメラトニンを明期後半に経口投与したところ、投与開始 32 日目には対照群で 63% のスモルトが見られたのに対して、メラトニン投与群では 19% しかスモルトはみられなかった。よって、サクラマスにおいてはメラトニン投与は短日条件と同様に銀化を抑制することが明らかになった。以上の結果から、メラトニン投与により魚類の周期性を人為的に制御できる可能性が示された。魚類の日周リズム、年周リズムの確立維持におけるメラトニンの役割については今後さらに検討する必要がある。

7. 遊泳活動、摂餌活動リズムと生物時計

多くの魚類の遊泳活動、摂餌活動が日周リズムを示すことがこれまでに報告されているが、生物時計の関与については未だ不明な点が多い。¹⁾そこで魚類の遊泳活動、摂餌活動の日周性確立における生物時計とメラトニンの役割について検討するため、メラトニンリズムがすでに明らかにされているキンギョとニジマスの遊泳活動、摂餌活動を記録した。²⁵⁻²⁷⁾

両種の遊泳活動は明暗条件下では明暗周期に同調した日周リズムを、恒常条件下ではサーカディアンリズムを示し、遊泳活動が生物時計による支配を受けていることが明らかになった。^{25,26)} 血中メラトニン濃度がサーカディアンリズムを示す恒暗条件下においても、血中メラトニン濃度のリズムが消失する恒明条件下においても、遊泳活動のサーカディアンリズムは存続したので、遊泳活動リズムの維持に血中メラトニン濃度の変動は必須ではないと判断された。しかし、キンギョにおいては遊泳活動のサーカディアンリズムが二つ以上の有為な成分に分離するスプリットングが恒明条件下においてのみ観察されたので、松果体由来のメラトニンがキンギョの体内に存在する複数の生物時計の結合に関与している可能性も示された。

キンギョの摂餌活動を自発摂餌システムを用いて記録したところ、明暗条件下では明暗周期に同調した日周リズムを、恒常条件下ではサーカディアンリズムを示し、摂餌活動も生物時計による支配を受けていることが明らかになった。²⁷⁾しかし、明暗条件下における摂餌活動の活動期は同時に記録した遊泳活動の活動期とは必ずしも一致せず、また、恒暗条件下において遊泳活動と摂餌活動が異なる周期のサーカディアンリズムを示す個体も観察された。よって、キンギョの遊泳活動と摂餌活動は異なる生物時計に支配されていると推察された。

図2 魚類のサーカディアンシステム。

8. 魚類のサーカディアンシステム

以上、本稿においては魚類の日周リズムの形成機構について検討した結果を概説した。これらの研究成果を踏まえて描いた魚類の日周性を調節する生体内機構、すなわちサーカディアンシステムの全体像を図2に示す。生物時計を調節する最も重要な環境要因（すなわち同調因子）として光周期を考えた場合、魚類においては松果体、網膜、およびその局在がまだ同定されていない脳内光受容器の三者により光情報は受容されると考えられる。これらの光情報はそれぞれ松果体、網膜、視交叉上核に存在する生物時計に伝達され、それらの位相を調節する。さらに、これら複数の生物時計からの時刻情報は、ある出力系に対しては単独で、またある出力系に対しては統合された形で伝達され、器官レベル、個体レベルの日周リズムが形成されるのではないかと考えられる。また、このサーカディアンシステムは季節繁殖に代表される年周リズムの調節にも重要な役割を果たしているものと思われる。

9. おわりに

時間を軸として生命現象の周期性を研究する分野は時間生物学と呼ばれている。この時間生物学を魚類で展開することには基礎科学ならびに応用科学としての2つの側面がある。基礎的な側面としては「魚を知る」ため、そして「生物を知る」ための魚類の時間生物学という分野が分類できるだろう。魚類の示す周期性の発現機構解析は比較生物学の対象として興味深いものであるのみならず、生物一般の生物時計機構を解明するための興味深いモデルも提供してくれる。一方、応用科学として、時間生物学を「魚をつくる」、「魚を獲る」ために応用することもできる。魚類の養殖現場に摂餌リズムを応用するための自発摂餌システムの開発や、メラトニン投与による魚類の繁殖・行動制御がこの範疇に入るであろう。ま

た、朝まずめ、夕まずめという現象が知られているように、魚類の示す周期性について理解することはより効率的な漁獲を得るために必須の事項でもある。今後、基礎、応用の両側面から総合的に魚類の時間生物学を進展させ、魚類の周期性の成立機構についてさらに詳細な知見を得る必要がある。

謝 辞

本研究は東京大学農学部ならびに聖マリアンナ医科大学解剖学（旧第一解剖学）教室において行ったものである。本研究の遂行にあたりご指導ご鞭撻を賜った東京大学名誉教授羽生 功博士、東京大学農学部教授会田勝美博士に心から御礼申し上げる。また、温かい励ましの言葉を頂いた聖マリアンナ医科大学名誉教授鈴木卓朗博士、同解剖学教室主任教授平田和明博士に厚く御礼申し上げる。また、様々な面でご協力を賜った東京大学農学部古川 清博士、帝京科学大学理工学部教授田畑満生博士、ならびに多くの共同研究者の皆様に深く感謝する。

文 献

- 1) 羽生 功, 田畑満生: 水産動物の日周活動, 水産学シリーズ69, 恒星社厚生閣, 東京, 1988, pp. 1-138.
- 2) 田畑満生, 飯郷雅之: サーカディアンリズム, 放射線科学, **36**, 225-229 (1993).
- 3) J. E. Thorpe: Rhythmic Activity of Fishes. Academic Press, London, 1978, pp. 1-312.
- 4) M. A. Ali: Rhythms in Fishes. NATO ASI Series, Series A, Life Sciences, vol. 236, Plenum Press, New York, 1992, pp. 1-348.
- 5) Y. Suzuki, M. Orito, M. Iigo, H. Kezuka, M. Kobayashi, and K. Aida: Seasonal changes in blood IgM levels in goldfish, with special reference to water temperature and gonadal maturation. *Fisheries Sci.*, **62**, 754-759 (1996).
- 6) M. Iigo, H. Kezuka, T. Suzuki, M. Tabata, and K. Aida: Melatonin signal transduction in the goldfish, *Carassius auratus*. *Neurosci. Biobehav. Rev.*, **18**, 563-569 (1994).
- 7) 飯郷雅之: メラトニン合成酵素, 「生物時計の分子生物学」(海老原史樹文, 深田吉孝編), シュプリンガーフェアラーク東京, 東京, 1999, pp. 83-95.
- 8) H. S. Yu and R. J. Reiter: Melatonin. Biosynthesis, Physiological Effects and Clinical Application. CRC Press, Boca Raton, Florida, 1993, pp. 1-550.
- 9) 飯郷雅之: 魚類のメラトニンリズムに関する研究. 学位論文, 東京大学, 東京, 1996, pp. 1-171.
- 10) M. Iigo, F. J. Sánchez-Vázquez, J. A. Madrid, S. Zamora, and M. Tabata: Unusual responses to light and darkness of ocular melatonin in European sea bass. *Neuroreport*, **8**, 1631-1635 (1997).
- 11) F. J. Sánchez-Vázquez, M. Iigo, J. A. Madrid, S. Zamora, and M. Tabata: Daily cycles in plasma and ocular melatonin in demand-fed sea bass, *Dicentrarchus labrax*, L. *J. Comp. Physiol. B*, **167**, 409-415 (1997).
- 12) M. Iigo, M. Hara, R. Ohtani-Kaneko, K. Hirata, M. Tabata, and K. Aida: Photic and circadian regulations of melatonin rhythms in fishes. *Biol. Signals*, **6**, 225-232 (1997).
- 13) M. Iigo, K. Furukawa, A. Hattori, R. Ohtani-Kaneko, M. Hara, T. Suzuki, M. Tabata, and K. Aida: Ocular melatonin rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Biol. Rhythms*, **12**, 182-192 (1997).
- 14) M. Iigo, M. Tabata, and K. Aida: Ocular melatonin rhythms in a cyprinid teleost, oikawa Zacco platypus, are driven by light-dark cycles. *Zool. Sci.*, **14**, 237-242 (1997).
- 15) K. Mizusawa, M. Iigo, H. Suetake, Y. Yoshiura, K. Gen, K. Kikuchi, T. Okano, Y. Fukada, and K. Aida: Molecular cloning and characterization of a cDNA encoding the retinal arylalkylamine *N*-acetyltransferase of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Zool. Sci.*, **15**, 345-351 (1998).
- 16) H. Kezuka, M. Iigo, K. Furukawa, K. Aida, and I. Hanyu: Effects of photoperiod, pinealectomy and ophthalmectomy on circulating melatonin rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*. *Zool. Sci.*, **9**, 1047-1053 (1992).
- 17) M. Iigo and K. Aida: Effects of season, temperature, and photoperiod on plasma melatonin rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Pineal Res.*, **18**, 62-68 (1995).
- 18) M. Iigo, H. Kezuka, K. Aida, and I. Hanyu: Circadian rhythms of melatonin secretion from superfused goldfish (*Carassius auratus*) pineal glands *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **83**, 152-158 (1991).
- 19) M. Iigo, S. Kitamura, K. Ikuta, F. J. Sánchez-Vázquez, R. Ohtani-Kaneko, M. Hara, K. Hirata, M. Tabata, and K. Aida: Regulation by light and darkness of melatonin secretion from the superfused masu salmon (*Oncorhynchus masou*) pineal organ. *Biol. Rhythm Res.*, **29**, 86-97 (1998).
- 20) M. Iigo, M. Kobayashi, R. Ohtani-Kaneko, M. Hara, A. Hattori, T. Suzuki, and K. Aida: Characteristics, day-night changes, subcellular distribution and localization of melatonin binding sites in the goldfish brain. *Brain Res.*, **644**, 213-220 (1994).
- 21) M. Iigo, R. Ohtani-Kaneko, M. Hara, K. Hirata, and K. Aida: Melatonin binding sites in the goldfish retina. *Zool. Sci.*, **14**, 601-607 (1997).
- 22) M. Iigo, F. J. Sánchez-Vázquez, M. Hara, R. Ohtani-Kaneko, K. Hirata, H. Shinohara, M. Tabata, and K. Aida: Characterization, guanosine 5'-O-(3-thiotriphosphate) modulation, daily variation, and localization of melatonin binding sites in the catfish (*Silurus asotus*) brain. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **108**, 45-55 (1997).
- 23) M. Iigo, R. Ohtani-Kaneko, M. Hara, A. Hattori, H. Takahashi, M. Tabata, T. Suzuki, and K. Aida: Regulation by guanine nucleotides and cations of melatonin binding sites in the goldfish brain. *Biol. Signals*, **6**, 29-39 (1997).
- 24) M. Iigo, K. Furukawa, A. Hattori, M. Hara, R. Ohtani-Kaneko, T. Suzuki, M. Tabata, and K. Aida: Effects of pinealectomy and constant light exposure on day-night changes of melatonin binding sites in the goldfish brain. *Neurosci. Lett.*, **197**, 61-64 (1995).
- 25) M. Iigo and M. Tabata: Circadian rhythms of locomotor activity in the goldfish *Carassius auratus*. *Physiol. Behav.*, **60**, 775-781 (1996).
- 26) M. Iigo and M. Tabata: Circadian rhythms of locomotor activity in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *Fisheries Sci.*, **63**, 77-80 (1997).
- 27) F. J. Sánchez-Vázquez, J. A. Madrid, S. Zamora, M. Iigo, and M. Tabata: Demand-feeding and locomotor circadian rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*: Dual and independent phasing. *Physiol. Behav.*, **60**, 665-674 (1996).