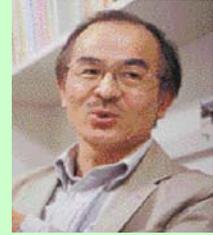


脊椎動物における光周性の分子機構解明

Molecular Mechanisms of Vertebrate Photoperiodism

海老原 史樹文 (Ebihara Shizufumi)

名古屋大学・大学院生命農学研究科・教授



研究の概要

植物の開花や動物の繁殖活動など、日長に伴う生命現象の変化は光周性反応として古くから知られている。しかし、脊椎動物における光周性の分子基盤は不明である。本研究は、哺乳類、鳥類及び魚類を用いて、光周性制御遺伝子 *Dio2* に関する研究を中心として、光入力から GnRH 放出に到る一連のプロセスを明らかにすることを目的とする。

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：生理、行動、生産機能制御

1. 研究開始当初の背景・動機

我々はウズラの光周性を制御する遺伝子 (*Dio2*) を特定することに成功した (*Nature, 2003*)。光周性反応における日長の伝達は、哺乳類では松果体で合成されるメラトニンの分泌リズムにより、一方鳥類では脳内光受容器を介して直接視床下部に伝えられる。鳥類では光により *Dio2* の発現が誘導され、哺乳類ではメラトニンが視床下部における *Dio2* の発現を調節する (*Endocrinology, 2004*)。すなわち、日長の伝達様式は違っても *Dio2* が脊椎動物の光周性制御に中心的役割を果たすことには変わりはない。そこで本研究では *Dio2* を中心として、光周性の分子機構を魚類、鳥類、哺乳類を用いて解明しようと試みた。

2. 研究の目的

光周期の受容から性腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) 放出に到る一連のプロセスを明らかにすることを目的として、以下の項目についての実験を行った。

①光周期処理機構の解明、②甲状腺ホルモン依存性機構の解明、③甲状腺ホルモン非依存性機構の解明、④GnRH 放出機構の解明、⑤ジーンチップを用いた新たな光周性鍵遺伝子の解明

3. 研究の方法

● ①光周期処理機構を解明するために、マウス時計遺伝子 *mPer1* のプロモーターの下流にホタルのルシフェラーゼをレポーター遺伝子として導入したトランスジェニックマウスなどを利用して調べた。そのために、発光イメージングシステムを購入した。

②甲状腺ホルモン依存性、③非依存性機構、また④GnRH 放出機構の解明を解明するために、分子生物学的手法、組織学的手法、生理学的手法を用いて検討した。⑤光周性関連遺伝子の網羅的解析をするために、DNA チップを用いた解析を行った。

4. これまでの成果

光周性反応の制御機構を解明するには、日長の読み取りから GnRH 放出に到る一連のプロセスを理解することが重要である。従って、それらのプロセスについて検討した。

①光周期処理機構の解明

● 日長情報が視交差上核 (SCN) でどのように処理されているかを時計遺伝子 (*mPer1*) の発現リズムを基に調べた。その結果、SCN の吻側方向半分領域の発現パターンが日長により変化することを明らかにした (*J Biol Rhythms, 2008*)。

● メダカの脳内に発現するオプシン遺伝子の cDNA クローニングを行い、VAL オプシン cDNA 全長の塩基配列とゲノム構造を解明した。また、メダカを対象として光受容体特異的に発現するメラトニン合成酵素 AANAT の cDNA クローニングを行い、3種の AANAT cDNA の塩基配列とゲノム構造を解明した。

②甲状腺ホルモン依存性機構の解明

● 短日繁殖動物のヤギでは長日繁殖動物とは逆に、長日条件下で *Dio2* の発現が抑制されることを明らかにした (*Endocrinology, 2006*)。また、周年繁殖する Wistar ラットでは日長が変化しても

*Dio2*の発現が変わらないのに対して、長日性の Fischer344 ラットでは *Dio2* が長日で高く、短日で低くなることを見出した (*Am J Physiol*, 2007)。長日繁殖動物では *Dio2* の発現が長日で高くなり、不活性型の T_4 が活性型の T_3 になる。一方、3型脱ヨウ素酵素 (*Dio3*) は T_3 を不活性型の甲状腺ホルモンに変換するが、この遺伝子は *Dio2* とは逆に短日で高く、長日で低くなることをウズラで見出した (*Endocrinology*, 2005)。さらに、甲状腺ホルモンは脂溶性のため拡散により細胞内に取り込まれると考えられてきたが、有機陰イオントランスポーター (Oapt1c1) により *Dio2*, *Dio3* が発現する脳室上衣細胞へ能動輸送されることを明らかにした (*Endocrinology*, 2006)。これらの成果は、*Endocrinology* 誌、*News & Views* で紹介された。

● *Dio2* により活性化された甲状腺ホルモン T_3 が GnRH 放出をもたらす機構を明らかにするために正中隆起の微細構造を調べ、 T_3 が GnRH 神経終末を取り囲むグリア細胞の形態変化を起こすことを明らかにした (*Cell Tissue Res*, 2006)。

③甲状腺ホルモン非依存性機構の解明

● ディファレンシャル解析で光周性の新たな制御因子の探索を行った。その結果、TGF α と insulin receptor (IR) を発見した (*Endocrinology*, 2007; *Brain Res*, 2007)。

④GnRH 放出機構の解明

● メタスチンが GnRH および性腺刺激ホルモンの強力な放出因子であり、その作用部位が脳内の特定の領域であることを明らかにした (*Endocrinology*, 2005)。また、メタスチンは性成熟のみならず成熟個体における性周期の維持にも第一義的な働きをするペプチドであることを確かめた (*J Rep Dev*, 2007)。さらに、泌乳期における性腺機能抑制においても生理的に重要な役割を果たしていることを発見した (*Endocrinology*, 2007)。

⑤光周性関連遺伝子の網羅的解析

● ジーンチップを用いた新たな光周性鍵遺伝子を発見した。光周性シグナル伝達経路で MBH での *Dio2* 発現の急激な誘導が鍵となることを既に明らかにしているが、ニワトリのジーンチップを用いて、甲状腺刺激ホルモン (TSH) β サブユニットがその誘導の引き金を引くことを発見した。すなわち、脳深部光受容器で受容した光情報が下垂体隆起葉で TSH β サブユニットの発現を誘導し、第3脳室の脳室上皮細胞の存在する TSH 受容体に結合して *Dio2* の急激な発現をもたらすことを示した。 (*Nature*, 2008)。

5. これまでの進捗状況と今後の計画

引き続き従来の研究を行うが、特に、新たに発見した TSH β サブユニットの発現制御を中心とした光感受相のゲーティング機構の解明、光周性生理機能の多面的展開を新たに加える。研究課題は以下の通りである。①光周期処理機構の解明、②甲状腺ホルモン依存性機構の解明、③甲状腺ホルモン非依存性機構の解明、④GnRH 放出機構の解明、⑤光感受相のゲーティング機構の解明、⑥光周性生理機能の多面的展開

6. これまでの発表論文等

(研究代表者は太字、研究分担者には下線)

1. Nakao N, Iigo M, **Ebihara S**, Ueda HR, Yoshimura T. (他 17 名) Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature* 452:317-22, 2008
2. Naito E, Watanabe T, Tei H, Yoshimura T, **Ebihara S**. Reorganization of the suprachiasmatic nucleus coding for day length. *J.Biol.Rhythms* 23:140-149, 2008
3. T.Takagi, T.Yamamura, T.Anraku, S.Yasuo, N.Nakao, M.Watanabe, M.Iigo, **S.Ebihara**, T.Yoshimura. Involvement of TGF{alpha} in the photoperiodic regulation of reproduction in birds. *Endocrinology* 148:2788-2792, 2007
4. S.Yasuo, M.Iigo, K.Maeda, G.Lincoln, **S.Ebihara**, T.Yoshimura, (他 10 名). Long day suppressed expression of type 2 deiodinase gene in the mediobasal hypothalamus of the Saanen goat, a short day breeder: Implication for seasonal window of thyroid hormone action on reproductive neuroendocrine axis. *Endocrinology* 147:432-440, 2006
5. N.Nakao, M.Iigo, **S.Ebihara**, T.Yoshimura, (他 5 名). Possible involvement of organic anion transporting polypeptide 1c1 in the photoperiodic response of gonads in birds. *Endocrinology* 147:1067-1073, 2006
6. T.Yamamura, **S.Ebihara**, T.Yoshimura (他 2 名). T_3 implantation mimics photoperiodically reduced encasement of nerve terminals by glial processes in the median eminence of Japanese quail. *Cell Tissue Res*. 324:175-179, 2006
7. M.Kinoshita, H.Tsukamura, K.Maeda (他 8 名). Involvement of central metastin in the regulation of preovulatory luteinizing hormone surge and estrous cyclicity in female rats. *Endocrinology* 146, 4431-4436, 2005

上記以外の発表：英文論文 45 編、和文論文 7 編、著書 2 編、招待講演 20 件、国際会議発表 26 件、国内学会発表 93 件
ホームページ等

<http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~rhythm/>