

Hypothalamic Expression and Moonlight-Independent Changes of *Cry3* and *Per4* Implicate Their Roles in Lunar Clock Oscillators of the Lunar-Responsive Goldlined Spinefoot

Riko Toda, Keiko Okano, Yuki Takeuchi, Chihiro Yamauchi, Masato Fukushima, Akihiro Takemura, Toshiyuki Okano

PLoS One 9, e109119 (2014)

doi:10.1371/journal.pone.0109119

月齢応答性のゴマアイゴにおける *Cry3* および *Per4* の脳深部発現および月光非依存的な変動は月齢時計発振体機能を暗示する

戸田りこ¹、岡野恵子¹、竹内悠記²、山内千裕²、福代真¹、竹村明洋²、岡野俊行¹

¹早大,²琉球大

【本論文のポイント】

ゴマアイゴの月齢同調産卵にクリプトクロム3 (*SgCry3*) が関与する可能性を以前に突き止めた。そこで、脳内のクリプトクロム3タンパク質 (*SgCRY3*) の発現細胞を調べたところ、生殖応答に関与する部位に局在していた。さらに、月齢の認知機構を知るために、野外で二週間月光を遮断して飼育したゴマアイゴのクリプトクロム3の発現を調べた。その結果、月齢依存的な振動は月光遮断の影響を受けず、ゴマアイゴ少なくとも2週間以上の時間を測定する能力をもっていると推定された。

【概要】

多くの生物は生理学的機能を外界の環境サイクルと同期させるために、その生体内に生物時計を持っている。サンゴやアイゴは、特定の月齢の日に合わせて産卵する。たとえば、サンゴ礁に生息するゴマアイゴは、夏の上弦の月の夜にのみ産卵する。この行動は月齢同調産卵と呼ばれ、そのメカニズムは不明であるが、月の位相に依存した月光の持続時間や光強度などをとらえて、およそ29.5日の期間をもつ月齢サイクルに同調する仕組みが体内に存在するのではないかと推測される。

我々はこれまでに、ゴマアイゴを異なる月齢でサンプリングし、概日時計関連分子であるクリプトクロム遺伝子の脳内発現量を定量的RT-PCRにより調べた結果、クリプトクロム3 (*SgCry3*) の mRNA レベルが、月齢に依存して変化、すなわち新月から産卵期である上弦にかけてピークを示すことを報告した[Fukushima et al., 2011]。そこで今回、(1) *SgCRY3* タンパク質が発現しているのか、(2) *SgCRY3* を発現している細胞はどのような細胞か、(3) *SgCRY3* は各月齢において月光の量に応じて振動しているのか、それとも、月齢の進行を長期間にわたって記憶して変動する因子なのか、を明らかにするための実験を行なった。なお、本研究は早稲田大学と琉球大学との共同研究として行われた。

結果

まず始めに、上記の(1)および(2)の問題に答えるため、*SgCRY3* の C 末端に対するポリクローナル抗体 (α *SgCRY3*CT 抗体) を

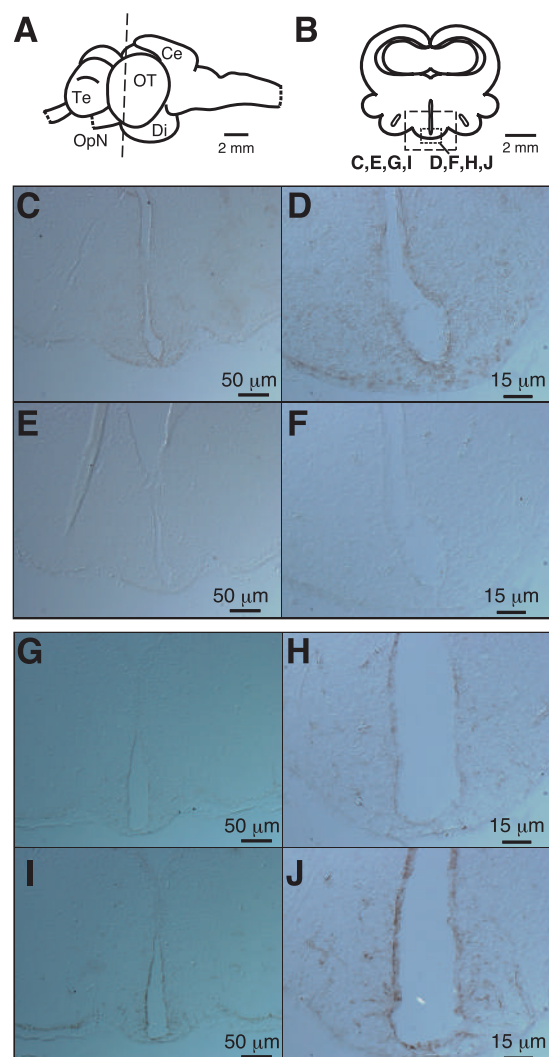


図1 ゴマアイゴ視床下部におけるクリプトクロム3の発現解析 (免疫組織化学)

作製し、ゴマアイゴにおける SgCRY3 の細胞局在を調べるため。作製した抗体を用いて、終脳から小脳への脳切片に対して免疫組織化学染色を行ったところ、間脳の MBH(Medio-Basal Hypothalamus)の上皮細胞や脳脊髄液接触神経において SgCRY3 免疫反応が確認された(図 1)。この領域は、ウズラにおいて光周性^{※1}の光受容に関わる部位に相当し、光受容体が発現すると示唆されている。したがって、月光認識が光周応答に似た仕組みを利用しているのではないか、という以前の我々のモデルとよく合致する。

続いて、(3)の疑問に答えるために、新月から満月までの2週間に渡って月光を遮断する実験(図 2)を行った。この実験では、自然光下で長期に飼育されていたゴマアイゴを4つのグループに分け、3群は毎晩夜間のみ夜の前半のみ、後半のみ、あるいは夕刻から日の出前まで、黒いシートをかけて月光を遮断した。残りの1群は対照群として、自然光下においた。

それぞれの群の魚より3-4日ごとに間脳をサンプリングして、SgCry3 および SgCry と相互作用する可能性のある Per(Period)の発現量を調べた。その結果、SgPer4 (=SgPer1b)遺伝子の発現にも顕著な月齢依存性が見られ、SgCry3、SgPer4 いずれの遺伝子も月光遮断を遮断しても、自然光下と同様の振動性が観察された。この結果は、間脳のこれらの時計遺伝子は、月光に即時的に反応して変動しているのではなく、1月程度の長周期の振動性を持っており、おそらく1周期前(あるいは2周期以上前)の月光刺激に同期していると考えられた。このことから、ゴマアイゴの脳内には SgCry3 および SgPer4 を構成因子とする月齢時計が存在することが示唆された。

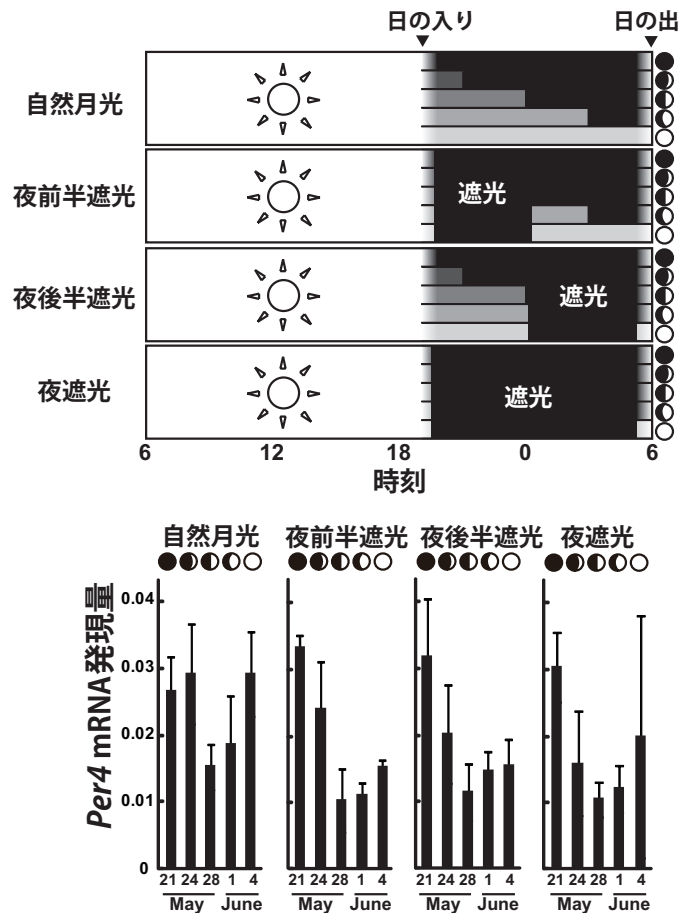


図 2 夜間に月光遮光してもゴマアイゴ視床下部での Per4 の月齢依存的な変動は持続する

[要約作成：山村祐木、岡野俊行]

【語句の説明】

※1 光周性：温帯では四季の変化が顕著である。温帯に生息する多くの動植物においては、季節に依存して繁殖行動や開花などが制御されている。これらの生物では、1日の昼間の長さ(日長)を指標にして季節を感知し、生殖腺の発達や行動が制御されており、これを光周性とよぶ。