

Moonlight Controls Lunar-Phase Dependency and Regular Oscillation of Clock Gene Expressions in a Lunar-Synchronized Spawner Fish, Goldlined Spinefoot

Yuki Takeuchi, Ryo Kabutomori, Chihiro Yamauchi, Hitomi Miyagi, Akihiro Takemura, Keiko Okano, Toshiyuki Okano

Sci. Rep. 8, 6208 (2018)

doi:10.1038/s41598-018-24538-1

月齢に同調して産卵するゴマアイゴでは、月光が時計遺伝子発現の月齢依存性および正常な振動を制御している

竹内悠記¹、兜森涼¹、山口千裕²、宮城ひとみ²、竹村明洋²、岡野恵子¹、岡野俊行¹

¹早大,²琉球大

【本論文のポイント】

- ・トランスクリプトームによりゴマアイゴの時計遺伝子を多数同定した。
- ・月光遮断実験によって、月光が時計遺伝子の日内変動を安定化していることを見つけた。
- ・人工的に月光を再現する装置を作製し、脳内で月光に応答する時計遺伝子を調べた。

【概要】

ゴマアイゴは熱帯や亜熱帯の海に生息する魚で、月光を利用して夏の上弦の月の頃に一斉に産卵を行う。私達はこれまでに、時計遺伝子 (*Cryptochrome3* と *Period1*) が間脳において月齢に依存して発現変動することを見つけ、産卵のための月齢認識に関与している可能性を提唱した。また、2週間の月光遮断においてこれらの遺伝子の振動が影響を受けないことを明らかにした。そこで本研究では、2ヶ月にわたる月光遮断を行い、時計遺伝子に及ぼす影響を調べた。上記遺伝子を含め、3つの *Cry* と 2つの *Per*、2つの *Clock*、そして2つの *Bmal* 遺伝子をゴマアイゴにおいて同定し、さらに間脳に加えて下垂体での発現パターンを詳細に調べた。その結果、間脳と下垂体の *Cry3* を含む多くの時計遺伝子で日内発現パターンが変化し、特に月光遮断により発振が不安定となった。このことから、正常な月光刺激はゴマアイゴの月齢依存的な *Cry3* の振動と、同時に概日時計遺伝子の正常な日内振動に必要と考えられた。また、満月の直前の夜間に月光遮断を行うと、間脳と下垂体の *Cry1b* と *Cry2* の夜間の発現が増加したが、他の時計遺伝子の発現量は変化しなかった。これらの結果から、ゴマアイゴが月齢依存的に産卵するためには、産卵する可能性のある月周期の一つ前の月周期で月光を受けることが重要であり、*Cry1b* や *Cry2* が月光応答に関わることを示唆している。

【研究背景】

多くの生物は行動や生理的活動を環境の周期的な変化に同調させることによって、生物学的なリズムを示している。様々な周期のリズムが報告されているが、月齢依存的な生理現象の分子メカニズムは不明な点が多い。ゴマアイゴは、上弦の月付近の夜に月齢同調産卵を行うが、これには月光が29.5日の周期で周期的に変化することが直接関わっていると推定されている。我々はこれまでに、ゴマアイゴにおいて *Cryptochrome* の mRNA が月齢依存的に発現することを報告した[Fukushiro et al., 2011]。また、2週間の月光遮断によって *Cry3* の発現パターンは変化しないことを明らかにした[Toda et al., 2014]。これらのことから、時計遺伝子が砂時計のような月齢タイマーのシグナル分子として作用している可能性、もしくは月光刺激を伴わない2月周期以上の振動をさせる概月時計を構成している可能性が考えられた。本研究では、間脳およびその下流の下垂体の両方において、*Cry*、*Per*、*Clock*、および *Bmal* の日内および月内発現パターンを調べた。それらの発現パターンを4週間の月光遮断後のものと比較し、ゴマアイゴの月齢認識のメカニズムを明確にすることを目的とした。

【研究内容】

ゴマアイゴを月光遮断群と月光照射群の2つの飼育タンクにわけ、月光遮断群は2月周期の間、夜間だけに黒いシートで覆い月光を遮断した。ME群は、夜間のみ透明のシートで覆い自然月光に晒されるようにした(図1)。2回目の月齢サイクルで4つの代表的な月齢において間脳と下垂体を取り出し、特定のプライマーを用いた定量的RT-PCR^{※1}により、時計遺伝子の日内発現パターンを解析した。なお、時計遺伝子の配列は、先に、ゴマアイゴ cDNA の RNA シーケンスによって決定しておいた。

、間脳と下垂体における日内発現プロファイルを Cosinor 法^{※2}により解析し、発現のピークを比較した(図2)。その結果、月光がある場合と比べ、遮断した際に時計遺伝子の発現ピークがずれる傾向が見られ、Per2のようにリズム性が失われる遺伝子も見られた。また、Cry3の発現は日内変動を示さなかったが、月齢依存的な変化を示し、月光遮断により月齢依存性が有意に変化した(図3)。この変化は、月光のない新月から上弦の月までの2週間で行っていることから、1周期目の月光遮断の影響を受けていることが強く示唆された。これらのことから、Cry3は概月発振体というよりは、産卵する可能性のある周期の1周期前の月光シグナルによって調節されて1月周期の間振動する砂時計のようなタイマーを構成している可能性が考えられる。

、いくつかの時計遺伝子は、月光の影響を受けて発現調節されている可能性が考えられた。自然月光下では、月光は光量と月の出入り時刻が徐々に変化する場合、こうした月光の繰り返しに反応する遺伝子と、即時的に月光に反応する遺伝子を区別するため、月光の強さが急激に上昇する満月の直前に夜の月光を遮断して時計遺伝子がどう変化するかを調べた。その結果、Cry1bとCry2の発現量が自然月光下もしくは人工月光下よりも月光遮断条件において有意に高くなった。このことから、Cry1bとCry2の月光に依存した発現量の減少が、満月でのCry1aの増加や、新月でのCry3の増加に参与している可能性が考えられた。

、今回の結果から、ゴマアイゴのCry3は月齢を認識するための砂時計型の内部タイマー因子である可能性が一層濃厚となった。しかし、月齢は、性成熟のような全身性の変化を引き起こすため、個体を用いた実験では限界があり、また、概日時計とは独立した内在性の概月時計を持つ可能性も否定されたわけではないため、時計遺伝子の機能阻害など、さらなる分析が必要であると言える。

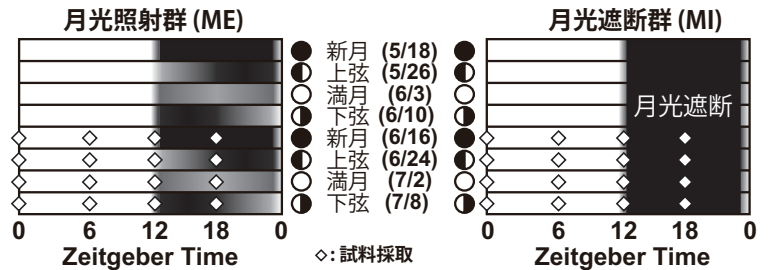


図1 月光遮断処理と試料採取点

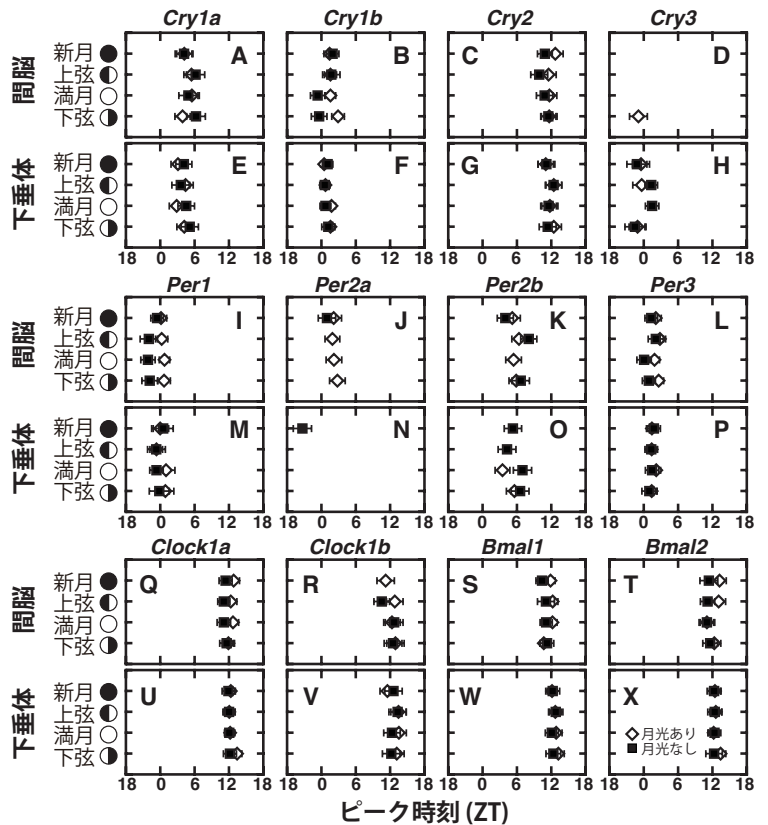


図2 月光遮断群および通常月光群における時計遺伝子リズムの位相

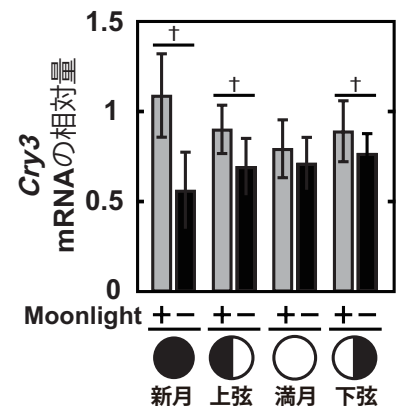


図3 月光遮断によるアイゴ間脳Cry3発現の変化

【語句の説明】

※ 1、定量的 RT-PCR : PCR の増幅をリアルタイムに測定し、その増幅率から mRNA などを定量する方法

※ 2、Cosinor 法 : リズムの解析法の一つで、余弦曲線を当てはめ周期や振幅、頂点位相を求める方法