

# 博士論文概要

## 論文題目

ドジョウにおける遊泳行動および眼球の  
時計遺伝子発現と光受容体の解析  
Analysis of swimming activity and  
ocular expression of clock genes and  
photoreceptors in Japanese loach

申請者

更谷	有哉
Yuya	SARATANI

電気・情報生命専攻 分子細胞生物学研究

2020年11月

ドジョウ (*Misgurnus anguillicaudatus*) は、日本をはじめとする東アジアに広く分布しており、日本人にとって古くから馴染み深い生物である。ドジョウは湖沼などの止水域の水底環境に適応しており、ゼブラフィッシュをはじめとする多くの遊泳性魚類とは生態が大きく異なる。このような生物において、光環境への応答である視覚について解析し、ゼブラフィッシュをはじめとするモデル生物と比較することは、生物の環境適応について理解する助けになる。タンパク質であるオプシンは、発色団であるレチナールと結合して光を受容する。オプシンの種類、数、発色団を調べることにより、光環境への適応を類推できる。一般的に、魚類は 4 色型色覚を持ち、この分子基盤は、M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, S, L という 4 グループの視覚オプシンであるが、薄明期はこれらとは別の Rh グループが担当する。これら 5 つのグループそれぞれの遺伝子数は、魚類の生息環境に応じて異なっている。ヒトは、発色団として A<sub>1</sub>-レチナールのみを持つが、魚類においては発色団に多様性があり、海水魚は A<sub>1</sub>-レチナールのみを発色団にもつ場合が多く、淡水魚は A<sub>1</sub>-レチナールのほか A<sub>2</sub>-レチナールを持つ場合が多い。A<sub>2</sub>-レチナールを発色団に持つ視物質は、A<sub>1</sub>-レチナールを持つ場合に比べて吸収波長が長波長にシフトし、長波長光が豊富な淡水環境に適応していると考えられている。

光は視覚に利用されるだけでなく、概日時計の光同調にも関わる。概日時計は生物が地球の昼夜サイクルに適応するために発達させた機構であり、動物の行動や生理を司る因子の 1 つである。概日時計機構は、内在的な遺伝子発現変動によって約 24 時間のリズムを作り出す発振系、外部刺激を用いて発振系の位相同調を行う入力系、発振系のリズムを生体の様々な反応に伝える出力系から成る。発振系において、時計タンパク質である CLOCK と BMAL の複合体が、*Period* や *Cryptochrome* の転写を促進する。その翻訳産物である PER と CRY の複合体が CLOCK:BMAL 複合体の転写促進を抑制することによって形成されるネガティブフィードバックループが、発振系のコアになっている。魚類における概日時計の分子レベルの研究は、モデル生物であるゼブラフィッシュに集中して進められてきた。ドジョウの概日時計を解析することは、生態を理解する助けになるほか、最適な光条件や給餌条件を決めるうえでも役立ち、養殖産業にも貢献できるだろう。

本研究では、このような背景に基づき、ドジョウの視覚と概日時計機構について、解析を行った。本論文は 5 つの章から成る。以下に概略を示す。

第 1 章は本研究の序論であり、動物の主要な光受容タンパク質であるオプシンと、脊椎動物の概日時計機構について解説したほか、ドジョウについての先行研究に言及し、本研究の意義を述べた。

第 2 章は本研究で用いた研究手法について記述した。ドジョウの行動測定系、時計遺伝子とオプシン遺伝子の部分配列同定と発現定量手法、視物質の分光解析手法と発現局在解析手法について説明した。

第 3 章では、ドジョウの概日時計機構の発振系、入力系、出力系、および眼球におけるオプシンの発現について解析した結果を記述した。まず、ドジョウの概日時計機構の出力系を解析するために、赤外線センサーを用いた小型魚類遊泳行動測定装置を使って、明暗条件下と恒暗条件下で行動量を測定した。その結果、大半の個体で明暗条件下では暗期に活発に行動し、光によって行動が抑制された。一方で、恒暗条件下では行動量の日内変動性が小さくなり、行動のリズム性が減衰する傾向が見られた。次に、概日時計機構の発振系を解析するために、ドジョウの時計遺伝子に着目した。ドジョウの遺伝子情報が不足していたため、脳と眼球の RNA シーケンスを行い、時計遺伝子の情報を取得した。これらの遺伝子の mRNA レベルを解析するにあたり、qRT-PCR 用のプライマーセットを設計した。この際、ゼブラフィッシュのゲノム情報を参考にしてイントロンの位置を推定し、PCR 領域にエキソンイントロンジャンクションを含むように留意した。これにより、ゲノム DNA 由来の増幅と cDNA 由来の増幅を区別できるように工夫した。設計したプライマーセットを用い、時計遺伝子の発現位相と光応答性を調べるために、明暗条件下と恒暗条件下における、眼球の時計遺伝子の mRNA 発現レベルを解析した。その結果、ドジョウの *Cry* 遺伝子と *Per* 遺伝子は、概日時計機構の制御を受けるもの、光応答性を持つもの、その両方の特徴を併せ持つもの、および明確な発現変動性を示さないものに分類することができた。

オプシン遺伝子に関しては RNA シーケンスのアセンブリからオプシンのトランスクリプトを同定し、オプシン遺伝子をコードしている可能性のある 21 の遺伝子配列を見つけた。次に、上記の時計遺伝子と同様の方法で RT-PCR 用のプライマーセットを設計し、ゲノム上の存在と眼球における発現を調べた。その結果、ドジョウの眼球では 7 種類の視覚オプシンの mRNA が発現していることがわかり、*Rh1*, *Rh1-2*, *Red-opsin* では特に強い発現シグナルが見られた。

ドジョウの眼球におけるオプシンのタンパク質レベルの発現量や組織局在についての知見を得るため、ウエスタンブロット解析、免疫組織化学解析、および分光学的解析を行った。ウエスタンブロット解析によりドジョウオプシタンパク質を検出できることを確認した抗ニワトリロドプシン血清 (cRh-C) を用い、免疫組織化学で組織局在を調べたところ、多くの桿体で陽性シグナルが検出された。分光解析の結果、520 nm に吸収ピークが見られ、さらに光照射前と光照射後の差スペクトルは 440 nm に単一の等吸収点を持つことから、退色が単一の成分によるものであることが示唆された。この結果から、ドジョウの網膜では、RT-PCR では強いシグナルが見られたにもかかわらず赤錐体は少なく、桿体視物質の割合が高いと考えられた。また、網膜視物質の吸収スペクトルの形から、桿体視物質の発色団は A<sub>1</sub>-レチナールではなく A<sub>2</sub>-レチナールであると考えられ、ドジョウの桿体視物質はロドプシンではなくポルフィロプシンであることが示唆された。一方

で、網膜におけるポルフィロプシンの密度を推定したところ、ヒトや、夜行性動物であるマウスよりも低いことがわかり、ドジョウは視力が低いことが示唆された。

最後に、眼球がドジョウの行動制御に対する主要な光入力器官であるかどうか検討するため、眼球切除がドジョウ行動に与える影響を調べた。眼球切除前と眼球切除後で、行動リズム性と行動リズムの周期長を比較したところ、どちらも有意差は見られず、眼球切除後もドジョウが光に応答していることが示唆された。したがって、ドジョウにおいては、眼球のみが行動を制御する光受容を担うわけではなく、脳や松果体といった網膜外の部位も光入力にかかわることが考えられた。

第4章では、第3章で得られた結果について、ゼブラフィッシュをはじめとする他の魚類と比較して考察した。明暗条件下と恒暗条件下において、ドジョウの行動を測定し、眼球における時計遺伝子発現を解析した結果から、ドジョウの行動は光によって抑制され、概日時計機構によっては弱く調節されている可能性が考えられた。ドジョウ眼球における *Cry* 遺伝子と *Per* 遺伝子の発現をゼブラフィッシュと比較すると、両者の間で発現位相はおおむね一致していた。ドジョウは夜行性であるのに対してゼブラフィッシュは昼行性であり、夜行性魚類と昼行性魚類の間で時計遺伝子の発現位相が保存されているとすれば、より下流のシグナル伝達経路で昼夜の行動が調節されていると考えられる。視覚オプシンは魚種によって多様性があり、夜行性魚類の中でも、ドジョウのように昼行性魚類と同じく5つのグループの視覚オプシンを持つものと、デンキウナギのように限られたグループの視覚オプシンしか持たないものが見られた。このことから、ドジョウは幅広い波長の光を受容していると考えられる。第4章ではこのほかに、ドジョウが夜行性である生態的意義についても考察した。

第5章では今後の展望や、本研究で得られた知見を水産業に応用する可能性について記述した。概日時計機構の位相調節には夜明け期や夕暮れ期の薄明期の光が重要な役割を果たす一方、本研究を含む多くの実験室環境では、地球の昼夜サイクルを再現するために、照明の点灯と消灯が瞬時に切り替わる方形波的な明暗サイクルを採用している。測定条件を自然環境に近づけると動物の行動が変化する例は、キイロシヨウジョウバエやゴールドデンハムスターなどで知られており、ドジョウにおいても薄明期を再現した実験を行えば、行動プロファイルが変化する、あるいは、明暗条件下から恒暗条件下に移行後のドジョウの行動リズム性が改善する可能性がある。優れた栄養価を持つドジョウは養殖対象としての可能性を秘めており、これらの知見を踏まえ、ドジョウにとって最適な飼育条件を確立することによって、効率的な養殖を実現できるだろう。

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

氏名 更谷 有哉 印

(2020年 11月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文 ○	<p><u>Yuya Saratani</u>, Yuki Takeuchi, Keiko Okano, Toshiyuki Okano  Clock gene expression in the eye exhibits circadian oscillation and light responsiveness but is not necessary for nocturnal locomotor activity of Japanese loach, <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>  Zoological Science. 37(2) 177-192. 2020.</p>
講演	<p>(国際学会発表) (ポスター)</p>
○	<p><u>Yuya Saratani</u>, Keiko Okano, Tomonori Aoki, Toshiyuki Okano  Photic regulation of locomotor activity of Cobitidae fish, Japanese loach (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>)  17th International Congress on Photobiology and 18th Congress of the European Society for Photobiology  2019. 8, Barcelona, Spain</p>
○	<p><u>Yuya Saratani</u>, Yuki Takeuchi, Keiko Okano, Toshiyuki Okano  Circadian/photoc regulation of locomotor activity and <i>Per/Cry</i> gene expression in Japanese loach, <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>  4th Core-to-Core International Symposium 3D Lab-Exchange Program  2018. 3, Bonn, Germany</p>
○	<p><u>Yuya Saratani</u>, Yuki Takeuchi, Keiko Okano, Toshiyuki Okano  Photic entrainment pathway circadian clocks in the peripheral tissues of Japanese loach, <i>Misgurnus anguillicaudatus</i>  The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan  2016. 11, Okinawa, Japan</p> <p>(国内学会発表) (ポスター)  <u>更谷有哉</u>、竹内悠記、岡野恵子、岡野俊行  ドジョウの眼球時計の光応答と光依存的な時計行動制御における眼球の役割  第6回東京女子医科大学 TWIns 研究交流セミナー  2019. 2, 東京</p>

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
その他	<p><u>更谷有哉</u>、竹内悠記、岡野恵子、岡野俊行 ドジョウの行動制御メカニズム解明に向けたトランスクリプトームおよび遺伝子発現解析 日本動物学会 第 89 回札幌大会代替大会 2018. 12, 東京</p>
	<p><u>Yuya Saratani</u>, Yuki Takeuchi, Keiko Okano, Toshiyuki Okano Locomotor activity of Japanese loach (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>) is regulated by environmental light 日本比較生理生化学会 第 40 回神戸大会 2018. 11, 神戸</p>
	<p><u>更谷有哉</u>、竹内悠記、岡野恵子、岡野俊行 ドジョウにおける行動リズムと時計遺伝子発現の解析 日本動物学会関東支部会 第 70 回大会 2018. 3, 東京</p>
	<p><u>更谷有哉</u>、竹内悠記、岡野恵子、岡野俊行 ドジョウ (<i>Misgurnus anguillicaudatus</i>) の末梢組織における時計遺伝子の光同調 日本動物学会関東支部会 第 68 回大会 2016. 3, 横浜</p>
	<p><u>更谷有哉</u>、竹内悠記、阿部大輝、岡野恵子、岡野俊行 ドジョウにおける <i>Cry1a, c</i> の同定と発現解析 第 22 回日本時間生物学会学術大会 2015. 11, 東京</p> <p>(論文) Keiko Okano, <u>Yuya Saratani</u>, Ayumi Tamasawa, Yosuke Shoji, Riko Toda, Toshiyuki Okano A photoperiodic time measurement served by the biphasic expression of <i>Cryptochromelab</i> in the zebrafish eye Scientific Reports. 10(1) 5056. 2020.</p>

## 早稲田大学 博士（理学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
	<p>(国際学会発表) (ポスター)</p> <p><u>Yuya Saratani</u>, Yuki Takeuchi, Keiko Okano, Toshiyuki Okano  Flow cytometric analysis of ploidy levels and next-generation sequencing of Japanese loach  5th Core-to-Core International Symposium 3D Lab-Exchange Program  2019.2, Okinawa, Japan</p> <p>(国内学会発表) (口頭)</p> <p><u>Yuya Saratani</u>, Yomonori Aoki, Keiko Okano, Toshiyuki Okano  Locomotor activity of Japanese loach under simulated natural light condition  日本比較生理生化学会 第42回山形大会  2020.11, 山形</p> <p>(国内学会発表) (ポスター)</p> <p><u>Yuya Saratani</u>, Ayumi Tamasawa, Keiko Okano, Riko Toda, Toshiyuki Okano  A photoperiod-dependent expression of <i>Cry1b</i> in the zebrafish eye  日本比較生理生化学会 第39回福岡大会  2017.11, 福岡</p>