

## 論文要旨

### 論文題目

#### Studies on Endogenous Regulation of Daily and Circadian Rhythmicity in Labrid Fish

#### ベラ科魚類における日周と概日リズムの内因性制御に関する研究

Wrasse species exhibit a definite daily rhythm in locomotor activity; they actively swim for foraging and reproduction during daytime but bury themselves in the sand at the bottom of the ocean at night. It remains unclear how their daily behavior is regulated endogenously. The aim of the present study was to examine an integrate role of neurohypophysial peptides – arginine vasotocin (AVT) and isotocin (IT) – and melatonin in exertion of daily and circadian behavior of the threespot wrasse *Halicoeres trimaculatus* (tropical wrasse) and honbera wrasse *H. tenuispinis* (temperate wrasse). Involvement of clock genes – *Period* (*Per1*, *Per2*), *brain and muscle aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator* (*ARNT*)-like (*Bmal1*), and *Cryptochrome* (*Cry1*) – in their daily and circadian system is also evaluated. The cDNAs of pro-AVT, pro-IT, and melatonin receptor (MTNR1A) were cloned and characterized. The deduced pro-AVT and -IT amino acid sequence of both fish consisted of 154 and 156 amino acids, respectively. The sequences of pro-AVT and -IT cDNAs contained a signal peptide followed by the respective hormone and neurophysin linked by a Gly-Lys-Arg bridge, which are characteristics of AVT and IT family. The full-length MTNR1A of the threespot wrasse encoded a protein of 350 amino acids. It contained the seven presumed transmembrane domains that are characteristic of the G-protein-coupled receptor family. RT-PCR revealed that pro-AVT mRNA was detected only in the hypothalamus area, while pro-IT mRNA in the telencephalon, optic tectum, medulla oblongata and spinal cord, and hypothalamus areas of the brain. *In-situ* hybridization showed that pro-AVT and MTNR1A mRNA were co-expressed in the preoptic area of the anterior hypothalamus, suggesting an integral connection and cross-talk between AVT and melatonin at this area of the brain. Pro-AVT/IT and melatonin showed an opposite fluctuation; the relative abundance of pro-AVT and -IT mRNA was greater at 12:00 h than at 24:00 h. Melatonin production by the cultured pineal gland increased during the nighttime and decreased during daytime. Following intraperitoneal administration of melatonin, pro-AVT mRNA abundance, but not pro-IT mRNA, decreased, suggesting that daily fluctuations of these two neurohypophysial peptides are differentially regulated. Melatonin treatment induced decreases in locomotor activity and respiratory rate, suggesting that melatonin has a sleep-inducing effect. When melatonin and AVT was co-injected to the fish, respiration rate returned to the normal level. Since locomotor activity was persisted under conditions of constant light (LL) and darkness (DD), it is regulated by the coordination of environmental stimuli and the endogenous circadian system. When daily and circadian rhythms of clock genes were determined, *Per1* and *Per2* mRNA abundance increased around lights on under LD. Robust oscillation of *Per1* and *Per2* mRNA expression persisted under DD and LL, respectively. Expression of *Bmal1* and *Cry1* mRNA also showed daily and circadian patterns. It is concluded that the daily and circadian rhythms of wrasse species are integrally regulated by endogenous factors such as hormones and clock genes. In especial, it is suggested that day-active and night-inactive rhythm is regulated by coordination of AVT as a diurnal hormone and melatonin as a night hormone, and that clock genes play a role in coordinating circadian rhythm of these hormones and locomotor activity in the hypothalamus.

氏名 HUR SUNG PYO

平成24年 2月14日

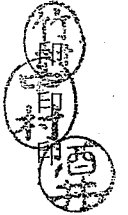
琉球大学大学院  
理工学研究科長 殿

論文審査委員

主査 氏名 竹村明洋

副査 氏名 中村 将

副査 氏名 酒井一彦



### 学位（博士）論文審査及び最終試験の終了報告書

学位（博士）の申請に対し、学位論文の審査及び最終試験を終了したので、下記のとおり報告します。

記

申請者	専攻名 海洋環境学 氏名 Hur Sung Pyo 学籍番号 <span style="background-color: black; color: black;">XXXXXXXXXX</span>
指導教員名	竹村明洋
成績評価	学位論文 <span style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; padding: 2px;">合格</span> 不合格 最終試験 <span style="border: 1px solid black; border-radius: 50%; padding: 2px;">合格</span> 不合格
論文題目	Studies on endogenous regulation of daily and circadian rhythmicity in labrid fish (ベラ科魚類における日周と概日リズムの内因性制御に関する研究)
審査要旨 (2000字以内)	
ベラ科魚類は明確な日周活動リズムを示し、昼間（主観的昼）には活発に活動するが、夜間（主観的夜）には潜砂をして活動を停止する。本研究は、ベラ科魚類（ミツボシキウセン及びホンベラ）の活動リズムの成立を内因性因子の変動から明らかにすることを目的として行われた。本研究では、特に神経葉ペプチドホルモン、メラトニン、そして時計遺伝子に着目し、人為制御された環境変動の中でこれらの内因性因子の日周および概日リズムを生理学的、行動学的、及び分子生物学的手法を用いて解明した。得られた研究成果は以下の通りである。	

(次頁へ続く)

## 審査要旨

1. 本研究でクローニングしたミツボシキウセン及びホンベラの神経葉ペプチドホルモン前駆体（プロアルギニンバソトシン；pro-AVT及びプロイソトシン；pro-IT）は、それぞれ154及び156アミノ酸残基をコードしていた。pro-AVT遺伝子は視床下部域にのみ発現していたのに対し、pro-IT遺伝子は終脳、視蓋、延髄、脊髄、そして視床下部域に広く発現していた。視床下部域におけるpro-AVT及びpro-IT遺伝子の発現は日周変動しており、両遺伝子とも昼間に高く、夜間に下がった。
2. ベラ科魚類2種のメラトニン受容体（MTNR1A）遺伝子は350アミノ酸残基をコードしており、G-タンパク質共役受容体の特徴を有していた。In-situ hybridization法により、MTNR1A遺伝子の脳内発現部位を確認したところ、視床下部域の視策前野に強い発現が見られたことから、AVTとメラトニンがこの部位において相互作用を持っている可能性があることが明らかとなった。事実、メラトニンを腹腔内注射した場合、視床下部域におけるpro-AVT遺伝子の発現量は減少したのに対し、pro-IT遺伝子発現量は変動しなかった。
3. 昼間の活動期のミツボシキウセンにメラトニンを腹腔内注射した場合、魚は行動を停止して呼吸量が減少した。AVTとメラトニンを同時に投与した場合、メラトニン投与効果を低減させることが明らかとなった。
4. 明期12時間・暗期12時間（LD=12:12）で飼育したミツボシキウセンの時計遺伝子（*Per1*、*Per2*、*Bmal1*及び*Cry1*）発現量の日周変動を調べた結果、*Per1*及び*Per2*は明期開始前後に発現のピークを持っていた。これらの遺伝子は恒明（LL）及び恒暗（DD）条件下で飼育した魚においても主観的昼間が始まる前後で増加した。一方、*Bmal1*及び*Cry1*は昼間から夕方にかけて増加した。これらの変動をミツボシキウセンの活動パターンと比較した場合、*Per1*及び*Per2*が日周活動の開始と関連があることが判明した。

多くの魚類は明確な日周リズムを示すが、これまでは規則正しい周期性がいかなる内的要因によって制御されているのかについてはほとんど研究がなされてこなかった。明確な日周リズムを刻むベラ科魚類を用いた本研究によって、内的制御機構の一端が明らかにされた。すなわち、（1）AVTが「昼間のホルモン」として働き活動の惹起に関与すること、（2）メラトニンが「夜間のホルモン」として夜間の活動停止と休息に関与すること、（3）これらの二つのホルモンが視床下部域で互いを制御しあっていること、そして（4）時計遺伝子のうち、*Per1*と*Per2*が日周性の時刻合わせに関わっていることが魚類ではじめて示された。一連の研究は、魚類における外部環境刺激が内的シグナルに転換される機構解明に一石を投じるものである。このような成果は、魚類をはじめとする脊椎動物の環境適応に重要な情報を時間生物学の基礎的な分野に提供するばかりでなく、人為的環境による水産生物のリズム制御を通しての水産振興に貢献するものと期待される。

学位論文の一部は論文としてまとめられ、すでに掲載発表済みである。これらは全て査読付き英文国際学術誌であり、内容に関する評価をすでに受けている。申請学位論文を各論文審査委員が熟読した後、学位論文審査会を開いて内容の検討を行った。その結果、審査委員の全会一致で申請学位論文の成績は十分に「可」に値するという結論に至った。

平成24年2月13日午前10時より、学位論文の内容に関する学力確認が理学部複合棟102教室にて行われた。最終試験としてパワーポイントを用いたコンピュータプレゼンテーションによる40分間の口頭発表と、発表内容に関する質疑応答を20分間行った。申請者は専門分野及び関連分野の質問に対して適切に回答をしていた。論文審査委員会は、琉球大学理工学研究科博士課程修了者としての十分な学力を有していると判断し、「合」に値するという結論に至った。以上のことから、本論文は海洋環境学専攻における博士の学位論文として十分価値のあるものであると判断された。論文審査委員会は全会一致で「合」とした。