

## 論文題目

**Title: Studies on environmental regulation of iodothyronine deiodinase genes in tropical fish**

Iodothyronine deiodinases play a role in regulating thyroid hormone (TH) dependant processes in vertebrates. The aim of this study was to clone and characterize the cDNA of type II (D2) and type III (D3) iodothyronine deiodinases of the goldlined spinefoot, *Siganus guttatus*, and to examine involvement of environmental factors in mRNA expression of D2 and D3 in the goldlined spinefoot and the sapphire devil, *Chrysiptera cyanea*. D2 of the goldlined spinefoot (SgD2) had 1013 bp that encoded a protein with 270 amino acids (aa) without the SECIS element. D3 of this fish (SgD3) yielded 1492 bp (269 aa) and a SECIS element between nucleotides 1267–1367. The deduced amino acid sequences of SgD2 and SgD3 showed high homology with those of fish in D2 and D3 clusters. Abundance of SgD2 and SgD3 mRNA in several tissues were expressed with an increase at 12.00 h and a decreased at 24.00 h. High expressions of these genes were observed in the brain and liver. Food deprivation suppressed the expression of SgD2, but not SgD3. The mRNA levels of SgD2 and SgD3 in the liver at 25 °C were higher than those reared at 20 and 30 °C. These results suggest that exogenous factors influence the mRNA levels of these genes in the liver and that transcription of the genes in certain tissues is partially regulated in a circadian manner. The abundance of hypothalamic D2 mRNA was higher at 12.00 h than at 06.00 h or 24.00 h. Rearing fish under constant dark conditions resulted in a decrease in SgD2 mRNA abundance during the subjective night. A single injection of melatonin lowered SgD2 mRNA abundance within 3 h. Collectively, it appears that hypothalamic SgD2 mRNA abundance is regulated by the circadian system and/or melatonin. No differences in D2 mRNA abundance were observed, when fish were reared at 20, 25, and 30 °C. However, food deprivation stimulated SgD2 mRNA expression during the daytime.

Effects of food availability and photoperiod on mRNA abundance of type-II (CcD2) and type-III (CcD3) iodothyronine deiodinase in the sapphire devil's brain were also examined. Fish out of breeding season were acclimated to LD12:12 and then transferred to long (LD14:10; LP) and short (LD10:14; SP) photoperiods with or without feeding for 1 week at 27 °C. The abundance of CcD2 and CcD3 mRNA in the brain was measured using quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR). Under LD12:12, no day/night change occurred in CcD2 and CcD3 mRNA abundance. Both genes' abundance in the fed and unfed fish was higher at 12.00 h than at 24.00 h under LP. Under SP, no day-night difference in CcD2 mRNA for the fed and unfed fish occurred, although its expression was higher in the unfed fish than the fed fish. On the other hand, abundance of CcD3 mRNA in the fed fish, but not unfed ones, was higher at 12.00 h than at 24.00 h under SP. These results are indicative of an interaction between photic stimuli and nutritional status on expressions of D2 and D3 mRNA in the hypothalamus and liver of these two fish. Since these are possible environmental factors affecting reproductive performance in fish, it is suggested that local concentrations of thyroid hormones change in accordance with aquatic environments which fish live in.

平成23年 8月 9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 池田 譲



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 Wambiji, Nina Nawanjaya 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 <input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格	最終試験 <input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格
論文題目	Studies on environmental regulation of iodothyronine deiodinase genes in tropical fish (熱帯棲魚類における甲状腺プロホルモン活性化酵素遺伝子の環境制御に関する研究)	
審査要旨 (2000字以内)		
<p>この研究は、水域環境変化が中枢神経系および末梢組織における甲状腺プロホルモン活性化酵素遺伝子の発現に及ぼす影響を調べることを目的として行われた。3種類ある甲状腺プロホルモン活性化酵素遺伝子のうち、魚類で重要な働きを持っている二種類 (D2 及び D3) に着目し、実験魚 (ゴマアイゴ、<i>Siganus guttatus</i> とルリスズメダイ <i>Chrysiptera cyanea</i>) の D2 及び D3 遺伝子の塩基配列を決定するとともに、発現部位の特定とその周期的変動に及ぼす要因の解明を行った。得られた研究成果の概要は以下の通りである。</p>		

(次頁へ続く)

## 審査要旨

1. ゴマアイゴ全脳の抽出物から甲状腺プロホルモン活性化酵素遺伝子をクローニングし、塩基配列を決定した。D1 及び D2 は、それぞれ 1013 及び 1492bp で、270 及び 269 個のアミノ酸をコードしていた。ゴマアイゴの D1 及び D2 は魚類の既知 D1 及び D2 と相同性が高かった。ゴマアイゴ D2 及び D3 遺伝子の発現は様々な組織に認められた。D2 遺伝子に関しては肝臓、皮膚及び脳で、そして D3 遺伝子に関しては肝臓、皮膚、網膜及び脳で高い発現が認められた。これらの組織における D2 及び D3 遺伝子の発現に関しては昼夜差が認められ、昼間の発現が夜間のそれよりも高くなった。
2. ゴマアイゴの肝臓における D2 遺伝子の発現は光、餌及び水温によって影響を受けた。光条件のうち恒暗条件で D2 遺伝子は主観的昼間に高くなった。また、D2 遺伝子は実験的飢餓条件下で減少した。さらに低水温 (20°C) 及び高水温 (30°C) は遺伝子の発現量を抑制した。一方、D3 遺伝子の発現は栄養状態と温度によって左右され、そのパターンは D2 遺伝子発現パターンと類似していた。
3. ゴマアイゴの脳における D2 遺伝子の発現は光と餌によって影響を受けた。光条件のうち恒暗条件で D2 遺伝子は主観的昼間に高くなり、メラトニン投与は D2 遺伝子の発現を抑制した。長日条件は D2 遺伝子の発現を誘導した。また、D2 遺伝子は実験的飢餓条件下で誘導された。
4. *In situ* hybridization 法によりルリスズメダイの D2 及び D3 遺伝子は視床下部域に強く発現していることが判明した。D2 及び D3 遺伝子ともに光と餌によって発現量が左右され、長日条件下では飽食状態で明瞭な明暗変化が認められたが、短日条件下では飢餓条件下での D2 発現量が誘導された。

高等脊椎動物では光周期の変化が視床下部域における甲状腺プロホルモン活性化酵素遺伝子発現パターンを変動させることが分かっている。魚類ではこのような研究はなされてこなかったが、本研究で得られた知見が世界ではじめてのものである。さらに、魚類では複数の環境因子が中枢および末梢組織の甲状腺プロホルモン活性化酵素遺伝子に關与していることが明らかになり、それぞれの部位での甲状腺プロホルモン活性化酵素遺伝子発現が環境要因によって異なることが明らかにされた。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2編の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「合」に値するという結論に至った。

平成23年8月8日午前10時より、学位論文の内容に関する学力確認を理学部本館114教室にて行った。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。申請者は質問に対して適切に回答をしていた。論文審査委員会は、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「合格」とした。