

論文要旨

論文題目

Studies on Expression and Rhythmicity of Melatonin Receptor Subtypes in the Neural Tissues of the Golden Rabbitfish, *Siganus guttatus*

熱帯性魚類ゴマアイゴの光応答性神経組織における
メラトニン受容体の遺伝子発現と光周性リズム解析

Melatonin receptors are expressed in neural and peripheral tissues and mediate melatonin actions on the regulation of circadian rhythms in various vertebrates species. In order to understand the molecular aspects of the “circa” rhythms in the golden rabbitfish *Siganus guttatus* which is a reef fish with a restricted lunar-synchronized spawning rhythmicity and releases gametes simultaneously around the first quarter moon period during the spawning season, the full-length cDNA of melatonin receptor subtypes (MT1, MT2 and Mel_{1c}) were cloned and characterized, and their diurnal/circadian regulations were examined. The full-length MT1 (1257 bp), MT2 (1808 bp), and Mel_{1c} (1747 bp) cDNAs contained an open reading frame that encodes a protein of 350, 354, and 353 amino acids, respectively. Their proteins were highly homologous to MT1, MT2 and Mel_{1c} of nonmammalian species.

Real-time quantitative PCR analysis revealed high expression of MT1 and MT2 mRNA with a day-night difference in neural and peripheral tissues and of Mel_{1c} mRNA only in neural tissues. When daily variations in MT1 and Mel_{1c} mRNA expression in the retina and whole brain were examined, an increase in the mRNA expression was observed during nighttime in both tissues under conditions of light/dark (LD), constant darkness (DD), and constant light (LL). The expression of MT2 was examined in the retina and whole brain under conditions of LD or DD, daily and circadian variations of mRNA expression with two increases, one during daytime and one at night for the brain and a single increase during nighttime in the retina were recognized. These results suggest that melatonin receptors are expressed in the neural tissues under circadian regulation with different expression patterns.

The expression of melatonin receptor mRNA in the discrete brain and the cultured pineal gland also showed daily variations. Daily variations of MT1 mRNA expression were observed in the retina, optic tectum and medulla oblongata-spinal cord, hypothalamus, and pituitary with significant increases at zeitgeber time (ZT)22, ZT18, ZT10, and ZT14, respectively. MT2 mRNA expression had daily variations with significant increase in the retina at ZT18, telencephalon at ZT10, optic tectum, cerebellum and medulla oblongata-spinal cord at ZT18, hypothalamus at ZT6, and

pituitary at ZT14. Significant increases in Mel_{1c} mRNA expression was evident in the retina, optic tectum and cerebellum at ZT18, telencephalon and hypothalamus at ZT10, and medulla oblongata-spinal cord at ZT14. It was suggested that each melatonin receptor subtype exhibit different physiological functions in the brain at different time. On the other hand, the mRNA expression in the cultured pineal gland showed with high expression levels during nighttime for MT1 and Mel_{1c} and during daytime for MT2; this suggests that the pineal gland of the rabbitfish is a possible oscillator of biological clock and that the increased expression level observed in the whole brain is partially of pineal origin.

Alternation of light conditions in the pineal gland cultures resulted in the changes in melatonin release into the culture medium as well as melatonin receptor mRNA expression in the pineal gland; light exposure suppressed the expression of MT1 and Mel_{1c} mRNA, whereas the same experimental regime stimulate the expression of MT2 mRNA. These results imply that the expression of melatonin receptor mRNA in the pineal gland is related to melatonin actions by photoperiod in natural habitats as well as by endogenous clocks. Contradict results appearing on expression pattern of melatonin receptor mRNA among species and experiment designs may be partially due to compound regulation of melatonin receptor. Addition of melatonin to the medium at lower concentration simultaneously with light exposure during nighttime induced expression of MT1 and Mel_{1c} mRNA in the pineal gland cultures, suggesting that melatonin is partially related to expression of MT1 and Mel_{1c} mRNA in the pineal gland of golden rabbitfish. The present results suggest that melatonin and its receptors play an important role in the exertion of daily and circadian variations in the neural tissues.

氏 名 朴 龍 柱

平成19年 2月15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	中 村 將
副査 氏名	上 原 剛
副査 氏名	須 田 彰一郎
副査 氏名	竹 村 明 洋



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 朴 龍柱 学籍番号 XXXXXXXXXX
指導教員名	中村 將
成績評価	学位論文 <input checked="" type="checkbox"/> 合格 <input type="checkbox"/> 不合格 最終試験 <input checked="" type="checkbox"/> 合格 <input type="checkbox"/> 不合格
論文題目	Studies on expression and rhythmicity of melatonin receptor subtypes in the neural tissues of the golden rabbitfish, <i>Siganus guttatus</i> (熱帯性魚類ゴマアイゴの光応答性神経組織におけるメラトニン受容体の遺伝子発現と光周期性リズム解析)
審査要旨（2000字以内）	
<p>この研究は、魚類の一日、一月、さらには一年の周期的活動が成立するための生理及び分子機構の一端を明らかにすることを目的として行われた。外部環境の明暗情報を全体に伝えるインドールアミン系ホルモン（メラトニン）の細胞膜受容体であるメラトニン受容体に着目し、実験魚（ゴマアイゴ、<i>Siganus guttatus</i>）のメラトニン受容体遺伝子（MT1、MT2及びMel_{1c}）の全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>	

審査要旨

1. 全脳の抽出物からメラトニン受容体遺伝子をクローニングし、全塩基配列を決定した。MT1、MT2 及び Mel_{1c} は、それぞれ 1257、1808 及び 1747bp で、350、354 及び 353 個のアミノ酸をコードしていた。このうち MT1 と MT2 は哺乳類以下の、Mel_{1c} は鳥類以下の脊椎動物のメラトニン受容体遺伝子と相同性が高かった。
2. メラトニン受容体遺伝子が発現している組織分布を調べた結果、MT1 と MT2 の発現は中枢組織（眼及び全脳）や末梢組織（肝臓、心臓、脾臓及び腎臓）に認められた。これに対し、Mel_{1c} は中枢組織（眼と全脳）にのみ発現し、メラトニン受容体遺伝子間で組織分布が異なり、機能的な違いが示唆された。いずれの組織に発現しているメラトニン受容体遺伝子も昼夜変動をしていた。
3. 12 時間明期・12 時間暗期 (LD12:12) の光条件で飼育した魚の眼と全脳におけるメラトニン受容体遺伝子の発現量は明確な日周変動を示した。このうち、MT1 と Mel_{1c} の発現量は夜に増加し、MT2 のそれは昼に増加した。恒暗 (DD) 及び恒明 (LL) の光条件で飼育した魚の眼と全脳においても LD12:12 と類似したメラトニン受容体遺伝子の変動が認められた。メラトニン受容体遺伝子に光周期性と概日周期性があることが判明した。
4. LD12:12、DD 及び LL の各光条件で生体外培養した松果体におけるメラトニン受容体遺伝子の発現は、全脳におけるそれとほぼ同様のパターンを示した。全脳におけるメラトニン受容体の発現の一部は、魚類の中枢時計の場所と考えられる松果体が担っていると考えられた。
5. 生体外培養した松果体に光を当てると、MT1 と Mel_{1c} の発現は増加したのに対し、MT2 のそれは減少した。また、培養液中にメラトニンを加えることにより、メラトニン受容体遺伝子の発現量が変化した。光とメラトニンがメラトニン受容体遺伝子の発現に関係があることが示唆された。
6. 松果体におけるメラトニン受容体遺伝子の発現は月周性を示し、満月と新月時 (24:00) では異なっていた。すなわち、暗い夜である新月時の MT1 と Mel_{1c} 発現量は明るい夜である満月時のそれより高くなった。MT2 の発現量は満月の方が高くなった。

本研究では、海産魚でのメラトニン受容体遺伝子の全塩基配列が世界で初めて決定された。これまで行われてきた魚類での生体リズム研究のほとんどが、環境変化とメラトニンの挙動に集中していたが、本研究によってホルモン（メラトニン）の標的器官におけるリズム制御の分子機構の一端が明らかにされた。さらに、下等脊椎動物でのメラトニン受容体の役割も解明され、脊椎動物全般におけるメラトニンとメラトニン受容体の概要解明に道筋をつけた。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 3 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19年2月6日午後3時より、学位論文の内容に関する学力確認を理学部528教室にて行った。最終試験としてパワーポイントによる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。申請者は韓国人留学生であるが、日本語で発表を行うとともに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。