

## 鳥類の時計遺伝子と光周性

安尾しのぶ、渡邊美和、海老原史樹文、吉村 崇

名古屋大学大学院生命農学研究科バイオモデリング講座

温帯地域の多くの鳥類では日長に応じて性腺軸の活性やプロラクチンの分泌量が変化する。日長計測には概日時計が利用されていることが知られているが、日長を測る時計の存在はいかなる種でも明らかではない。最近、我々はウズラの光周性制御部位として知られる視床下部内側基底部 (mediobasal hypothalamus, MBH) において、これまで鳥類でクローニングされている全ての時計遺伝子が発現していることを明らかにした。さらにその発現パターンはいかなる光条件でも変化しなかった。これらの結果から、MBHには光感受相を一定の位相に保持する光周時計が存在する可能性を指摘した。一方、プロラクチン分泌の光周性制御部位と思われる下垂体隆起葉 (pars tuberalis, PT) でも時計遺伝子が発現していた。特に *Per2* と *Cry1* が強く発現しており、日長に応じてその位相関係が変化した。*Per2* と *Cry1* は複合体を形成して時計制御遺伝子の活性を変化させるため、日長はそれらの位相関係の変化を通じて分子レベルの変化に置き換えられることが考えられた。またこの機構はヒツジのPTで示唆されているものと同様であり、鳥類と哺乳類とで光周性制御機構が保存されている可能性が考えられた。

### はじめに

温帯に棲息する多くの鳥類は1年の中で変化する日長を読み取り、繁殖に適した季節に性腺の増大や換羽などの生理反応を示す。このような性質は光周性と呼ばれ、餌の豊富な時期と子育ての時期を一致させるために生物が獲得してきた生殖戦略の一つである。日長は概日時計を利用して計測されることが知られている。哺乳類は概日時計を通じて出力されたメラトニンの分泌亢進時間の長さで日長を判断するが<sup>1)</sup>、鳥類ではメラトニンは光周性に関与しない<sup>16)</sup>。また鳥類の概日時計振動体である眼や松果体や視交叉上核を除去しても光周性反応は正常に起こることから<sup>5, 15, 43)</sup>、日長を測る「光周時計」がこれらの部位以外に存在すると考えられてきた。しかし鳥類では概日時計を刻む因子が分かっていたため、「光周時計」の正確な位置や分子メカニズムは全く検討されていなかった。近年鳥類の時計遺伝子がクローニングされ<sup>2, 7, 10, 37, 47, 50)</sup>、日長計測機構を分子レベルで探る突破口が開かれた。この総説では我々がこれまでに行ってきた時計遺伝子の発現解析の結

果をもとに鳥類の光周性における時計遺伝子の役割について概説する。

### 1. 性腺軸の光周性制御部位

性腺軸に関する光周性制御は視床下部ホルモンの調節により行われている。即ち、視床下部の正中隆起 (median eminence, ME) に蓄積された性腺刺激ホルモン放出ホルモン (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) が光周時計の制御を受けて下垂体門脈に放出され、続いて下垂体から黄体形成ホルモン (luteinizing hormone, LH) や卵胞刺激ホルモン (follicle-stimulating hormone, FSH) が分泌されると生殖腺が増大する<sup>6)</sup>。

ウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) は短日条件から長日条件に移すと初日からGnRHやLHの増加が見られ<sup>33)</sup>、短期間で劇的に精巣重量が変化することから古くより光周性の実験に用いられてきた。ウズラを用いた数多くの実験結果から、光周性制御部位は漏斗核 (infundibular nucleus, IN) やME、視床下部背側部 (dorsal hypothalamus, DH) を含む視



床下部内側基底部 (mediobasal hypothalamus, MBH) であることが知られている。例えばINやME、DHを局所的に破壊すると光周性反応が阻害されることが報告されている<sup>4, 35, 40</sup>。さらにMBHを電気刺激するとLHの上昇や生殖腺の発達を再現できること<sup>14, 36</sup>、c-Fosタンパクが光周性反応時に特異的にINやMEで発現することも示されている<sup>26, 27</sup>。また光ファイバーや発光ビーズを用いた局所的照射実験から、光周性に影響を及ぼす光はMBHで受容されることが示唆されている<sup>38, 39</sup>。さらにオプシン抗体の一つであるRET-P1に対する免疫陽性反応がINに検出されている<sup>42</sup>。これらのことから、MBHには光周性に関する光入力、光周性反応開始時の神経活動、内分泌系への出力といった光周性反応に重要なコンポーネントが含まれることが示唆されてきた。

MBHの光周性における重要性は哺乳類に関する報告からも伺える。哺乳類ではメラトニンが暗期の長

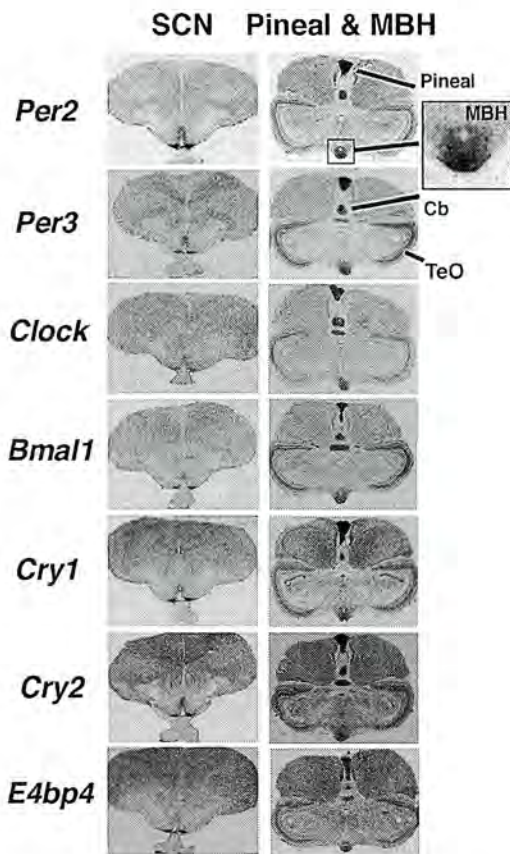


図1 ウズラの視交叉上核 (SCN)、松果体 (Pineal)、および視床下部内側基底部 (MBH) における時計遺伝子の発現<sup>48)</sup>  
*Per2*のMBHにおける発現の拡大図 (四角で囲った部分) を右に示した。検討した全ての時計遺伝子がSCN、松果体、MBHに発現していた。Cb: 小脳、TeO: 視蓋

さを伝達するが、MBHにはメラトニン受容体が存在することや<sup>46)</sup> ハムスターのMBHを破壊すれば光周性反応が阻害されることが示されている<sup>1, 25)</sup>。またヒツジの様々な脳部位にメラトニンを投与するとMBHに投与した時のみにLHの分泌量が変化する<sup>19, 22, 23)</sup>。これらの報告から、メラトニンの長さを読み取り性腺軸の活性を制御する機構がMBHに存在すると考えられてきた<sup>24)</sup>。

## 2. MBHの時計遺伝子発現

MBHが光周性の制御に重要であることが知られてきたにも関わらず、MBHに光周時計が存在するか否かはいかなる種でも全く分かっていなかった。近年鳥類において数々の時計遺伝子がクローニングされ、概日時計の分子機構が解明されてきた<sup>2, 7, 10, 37, 47, 50)</sup>。

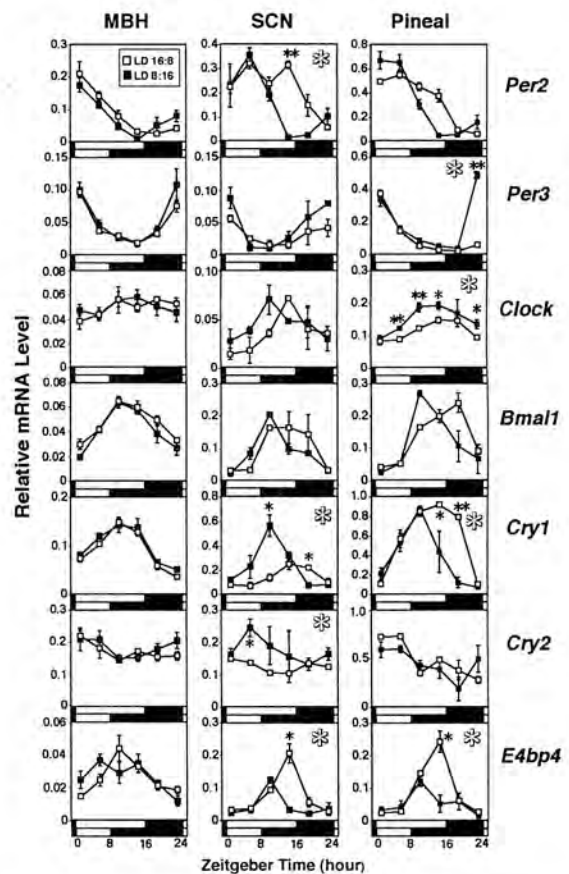


図2 長日条件と短日条件における、ウズラの視交叉上核 (SCN)、松果体 (Pineal)、および視床下部内側基底部 (MBH) における時計遺伝子の発現リズム<sup>48)</sup>  
 □が長日条件 (LD16:8)、■が短日条件 (LD8:16) を示す。各グラフの下は明暗条件を表す。長日条件群と短日条件群の差はグラフ右上の白いアスタリスクで (two-way ANOVA、\* $P < 0.05$ )、各サンプリングポイントにおける差は黒いアスタリスクで表した ( $t$ -検定、\* $P < 0.05$ 、\*\* $P < 0.01$ )。



我々はこれらを用いてウズラのMBHにおける光周時計の存在を検討した<sup>48)</sup>。その結果、鳥類でクローニングされている全ての時計遺伝子 (*Per2*, *Per3*, *Clock*, *Bmal1*, *Cry1*, *Cry2*, *E4bp4*) がMBHに発現していることが明らかとなった (図1)。さらにその発現様式を長日条件、短日条件、恒暗条件、恒明条件、光中断条件 (短日条件の暗期の様々な位相に短い光照射を追加した光条件) において網羅的に調べた。その結果、位相や振幅に大きな変化は認められず常に安定したリズムが刻まれていることが判明した。(図2、長日条件と短日条件のみ示す)。

これらの結果から、MBHには日長に影響されない光周時計が存在することが示唆された。我々が示した時計遺伝子発現の局在は、光周性反応開始時にc-Fosタンパクが誘導される部位や局所破壊により光周性反応が阻害される部位と一致し、これらの時計遺伝子発現が光周性制御機構に関与していることが考えられた。

MBHにおける時計遺伝子の役割は明らかではないが、ウズラの日長計測機構には光感受相の概日リズムが関係していることから<sup>49)</sup>、MBHの時計遺伝子は光感受相を制御することが考えられる。我々が示したようにMBHの時計遺伝子の発現パターンは様々な光条件で変化しなかったが、これは光感受相の位相が一定に保持されていることを示唆する。最近我々は甲状腺ホルモンのサイロキシン ( $T_3$ ) を活性型のトリヨードサイロニン ( $T_4$ ) に変換するtype2 iodothyronine deiodinase (*Dio2*) がMBHにおいて光感受相にのみ誘導され、 $T_3$ を脳室内投与すると光周性反応が再現できることを示した<sup>50)</sup>。したがってMBHの時計遺伝子は*Dio2*の発現誘導に時間依存性をもたらしていることが考えられるが、この点については今後の課題である。

### 3. プロラクチンの光周性制御機構

光周性反応はGnRH分泌の他、換羽や抱卵行動などを促すプロラクチンの分泌にも認められる<sup>3, 41)</sup>。プロラクチンの光周性制御機構は哺乳類で研究が進んでおり、高密度のメラトニン受容体が存在する下垂体隆起葉 (pars tuberalis, PT) が重要であることが知られている<sup>31, 32, 167)</sup>。PTからは日長に応じて tuberallin と呼ばれるプロラクチン放出促進因子が分泌され、下垂体前葉からのプロラクチン分泌量が調節される仕組みである<sup>12, 141)</sup>。さらに近年、ハムスターやヒツジのPTにおいて時計遺伝子が周期的に発現し<sup>20, 28-30)</sup>、その発現パターンを変化させてメラトニ

ンの長さを読み取っていることが示唆されている<sup>17, 18)</sup>。

一方、鳥類のPTとプロラクチンの光周性制御機構との関係はほとんど検討されていない。鳥類では視床下部から放出される血管作動性腸管ポリペプチド (vasoactive intestinal polypeptide, VIP) がプロラクチンの放出因子であるため<sup>8)</sup>、PTではなく視床下部が注目されてきたためである。しかしVIP神経が局在するMBHを破壊したウズラでも血中プロラクチン量は長日条件に正常に反応して上昇することから<sup>13)</sup>、プロラクチンの分泌制御が必ずしもVIPの完全な支配下にあるわけではなくPTが関与する可能性が考えられる。

### 4. PTの時計遺伝子発現

そこで我々はウズラのPTに注目し、時計遺伝子の発現を検討した<sup>18, 49)</sup>。MBHと同様、これまでにクローニングされている全ての時計遺伝子について検討したところ、*Per2*と*Cry1*が強く発現していることが明らかとなった。*Clock*や*Bmal1*などの発現も確認されたが、その発現は弱い傾向にあった。さらに様々な光条件で*Per2*と*Cry1*の発現パターンを検討した。驚いたことに、いかなる光条件でも一定のリズムが刻まれていたMBHと異なり、日長に応じて発現パターンの変化が見られた (図3)。最も顕著な

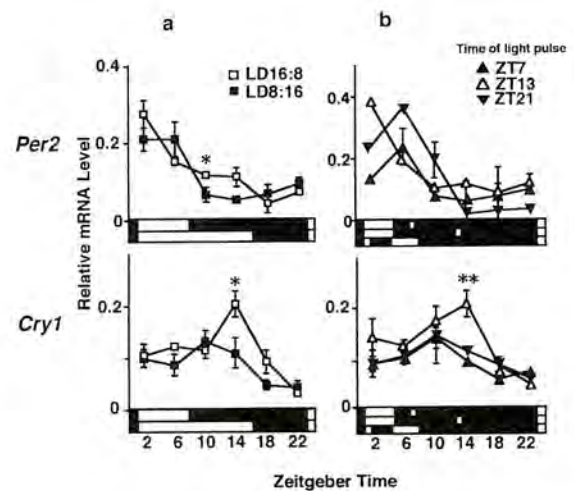


図3 ウズラの下垂体隆起葉における *Per2* と *Cry1* の発現リズム<sup>48, 49)</sup>

aは長日条件 (□, LD16:8) と短日条件 (■, LD8:16) を、bは光中断条件を表す。光中断条件では短日条件 (LD4:20) の暗期に30分の光パルスでZT7 (▲)、ZT13 (△)、ZT21 (▼) に10日間照射した。各グラフの下に示したバーは明暗条件を表す。各サンプリングポイントにおける差をアスタリスクで表した (one-way ANOVA, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ )。

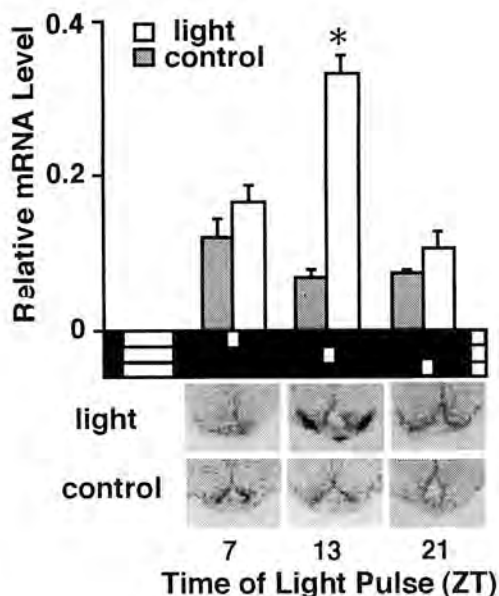


図4 ウズラの下垂体隆起葉における *Cry1* の光発現誘導<sup>49)</sup> 短日条件 (LD4:20) の ZT7、13、21 から 30 分の白色光を照射した。サンプリングは光照射終了から 90 分後に行った。グラフの下に各群のオートラジオグラムの代表例を示した。光感受相 (ZT13) 特異的に *Cry1* の発現が誘導された (Mann-Whitney *U*-検定、 $P < 0.01$ )。

変化は *Cry1* の発現ピーク時間に見られ、長日条件や光感受相を含んだ光中断条件ではピーク時間が後退した。この原因として *Cry1* の発現がそれらの光条件でのみ誘導されることが原因と考えられたため、次に暗期の様々な位相に光を照射して *Cry1* の発現誘導を検討した。すると光感受相でのみ *Cry1* の発現が誘導されることが明らかとなった (図4)。一方、*Per2* は日長が変化してもピーク時間は明期初期に保持されていた。

これらの結果からウズラの PT における日長計測機構のモデルを考えた (図5)。短日条件などの光感受相を含まない光条件では *Cry1* の発現は誘導されず、比較的弱いピークが明期と暗期の中間に存在する。しかし長日条件など光感受相に光が照射されれば *Cry1* の発現が誘導され、ピークが後退する。その結果、短日条件と長日条件で *Per2* と *Cry1* の位相関係が変化する。*Per2* と *Cry1* は複合体を形成して時計制御遺伝子の転写を制御するため<sup>21, 41)</sup>、これらの位相関係の変化を通じて日長が分子の変化に置き換えられることが考えられる。そして諸々のシグナルリレーを経てプロラクチンの分泌調節につながると考えられる。実際に、ウズラの血中プロラクチン量の変動はこのモデルに合致することを我々は確かめている<sup>49)</sup>。

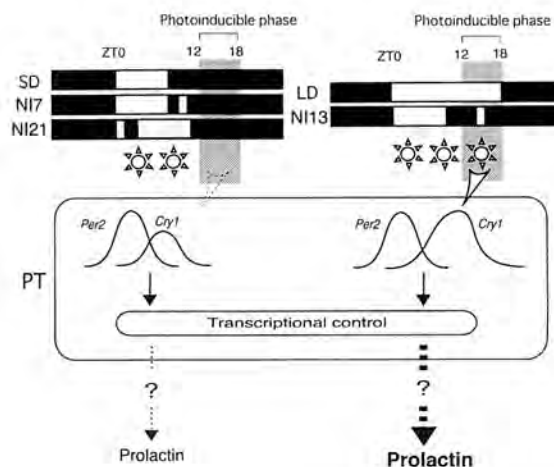


図5 ウズラの下垂体隆起葉 (PT) におけるプロラクチン分泌の光周性制御機構<sup>49)</sup>

*Per2* の発現リズムのピークはいかなる光条件でも明期開始付近に固定されている。一方 *Cry1* の発現は光感受相 (Photoinducible phase, ウズラの場合は ZT12-18) で特異的に誘導され、長日条件では発現のピークが後退する (図の右側)。その結果 *Per2* と *Cry1* の発現リズムの位相関係が変化する。その結果 *Per2* と *Cry1* は複合体を形成して時計制御遺伝子の転写を調節するため、位相関係の変化がプロラクチン分泌量の変化につながる。SD: 短日条件、LD: 長日条件、NI: 光中断条件

## 5. 鳥類と哺乳類における光周性制御機構の類似性

近年、ヒツジの PT で *Per* と *Cry* の発現リズムが長日条件と短日条件で変化することが報告され、PT における時計遺伝子がメラトニンの長さを分子レベルの変化に置き換える役割を担うことが示唆されている<sup>17, 18)</sup>。我々が示したウズラの PT における時計遺伝子の動態はヒツジにおけるこれらの報告と類似している。すなわち、日長を PT へ入力する媒体が違うが (ヒツジではメラトニン、ウズラでは光)、分子レベルでは同様の変化が起こっていると言える。したがって哺乳類と鳥類の間で光周性制御機構の基本的な部分は保存されていることが示唆された。

我々は最近 MBH における性腺軸の光周性制御についても哺乳類と鳥類で保存されている可能性を示した。ウズラの MBH では長日条件で *Dio2* の発現量が増加して性腺軸を活性化することが考えられているが、同様のことがハムスターでも観察されたのである<sup>45)</sup>。すなわち長日条件で *Dio2* の発現が増加し、さらに短日条件を模したメラトニン投与実験で発現が抑制された。これらのことは PT と同様、哺乳類と鳥類とでメラトニンや光などの入力経路の違いはあるが本質的なメカニズムは保存されていることを示唆している。



## おわりに

数年前から時計遺伝子は一日の時を刻む因子として同定されてきた。その同じ分子が日長を測ることに利用されているということは、生物が厳しい自然条件に際して同一の分子に様々な調節機構を形成しながら適応してきたことが伺えて大変興味深い。MBHやPTにおける時計遺伝子が実際にいかなる因子の転写調節に関わるのかはまだ明らかではないが、今後は時計遺伝子と相互作用する因子の同定や光の入力経路等を明らかにすることが必要である。

## 参考文献

- 1) Bae HH, Mangels RA, Cho BS, Dark J, Yellon SM, Zucker I: *J Biol Rhythms*. 14:391-401 (1999)
- 2) Chong NW, Bernard M, Klein DC: *J Biol Chem*. 275:32991-32998 (2000)
- 3) Curlewis JD: *Reprod Fertil Dev*. 4:1-23 (1992)
- 4) Davies DT, Follett BK: *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 191:285-301 (1975)
- 5) Davies DT, Follett BK: *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 191:303-315 (1975)
- 6) Dawson A, King VM, Bentley GE, Ball GF: *J Biol Rhythms*. 16:365-380 (2001)
- 7) Doi M, Nakajima Y, Okano T, Fukada Y: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98:8089-8094 (2001)
- 8) El Halawani ME, Youngren OM, Pitts GR: *Perspectives in avian endocrinology*, pp 403-416. Bristol, *J Endocrinol Ltd*. (1997)
- 9) Follett BK: *J Reprod Fertil Suppl*. 19:5-18 (1973)
- 10) Fu Z, Inaba M, Noguchi T, Kato H: *J Biol Rhythms*. 17:14-27 (2002)
- 11) Goldman BD: *J Biol Rhythms*. 16:283-301 (2001)
- 12) Hazlerigg DG, Hastings MH, Morgan PJ: *J Neuroendocrinol*. 8:489-492 (1996)
- 13) Juss TS: *Avian endocrinology*, pp 47-60, Bristol, *Soc Endocrinology*. (1993)
- 14) Konishi H, Foster RG, Follett BK: *J Comp Physiol [A]*. 161:315-319 (1987)
- 15) Konishi H, Iida K, Ohta M, Takahashi M: *Gen Comp Endocrinol*. 72:461-466 (1988)
- 16) Kumar V, Juss TS, Follett BK: *Melatonin and the pineal gland from basic sciences to clinical applications*, pp 163-168, Amsterdam, Elsevier Publ. (1993)
- 17) Lincoln GA, Andersson H, Hazlerigg DG: *J Neuroendocrinol*. 15:390-397 (2003)
- 18) Lincoln GA, Andersson H, Loudon A: *J Endocrinol*. 179:1-13 (2003)
- 19) Lincoln GA, Maeda KI: *J Endocrinol*. 132:201-215 (1992)
- 20) Lincoln GA, Messenger S, Andersson H, Hazlerigg DG: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:13890-13895 (2002)
- 21) Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR, Menaker M, Takahashi JS: *Science*. 288:483-492 (2000)
- 22) Malpoux B, Daveau A, Maurice F, Gayraud V, Thiéry JC: *Biol Reprod*. 48:752-760 (1993)
- 23) Malpoux B, Daveau A, Maurice-Mandon F, Duarte G, Chemineau P: *Endocrinology*. 139:1508-1516 (1998)
- 24) Malpoux B, Vigié C, Skinner DC, Thiéry JC, Chemineau P: *Brain Res Bull*. 44:431-438 (1997)
- 25) Maywood ES, Hastings MH: *Endocrinology*. 136:144-153 (1995)
- 26) Meddle SL, Follett BK: *J Comp Physiol [A]*. 176:79-89 (1995)
- 27) Meddle SL, Follett BK: *J Neurosci*. 17:8909-8918 (1997)
- 28) Messenger S, Garabette ML, Hastings MH, Hazlerigg DG: *Neuroreport*. 12:579-582 (2001)
- 29) Messenger S, Hazlerigg DG, Mercer JG, Morgan PJ: *Eur J Neurosci*. 12:2865-2870 (2000)
- 30) Messenger S, Ross AW, Barrett P, Morgan PJ: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96:9938-9943 (1999)
- 31) Morgan PJ: *J Neuroendocrinol*. 12:287-295 (2000)
- 32) Morgan PJ, Williams LM: *Rev Reprod*. 1:153-161 (1996)
- 33) Nicholls TJ, Follett BK, Robinson JE: *J Endocrinol*. 97:121-126 (1983)
- 34) Nicholls TJ, Goldsmith AR, Dawson A: *Physiol Rev*. 68:133-176 (1988)
- 35) Ohta M, Homma K: *Gen Comp Endocrinol*. 68:286-292 (1987)
- 36) Ohta M, Wada M, Homma K: *J Comp Physiol*

- [A]. 154:583-589 (1984)
- 37) Okano T, Yamamoto K, Okano K, Hirota T, Kasahara T, Sasaki M, Takanaka Y, Fukada Y: *Genes Cells*. 6:825-836 (2001)
  - 38) Oliver J, Baylé JD: *Experientia*. 38:1021-1029 (1982)
  - 39) Saldanha CJ, Leak RK, Silver R: *Psychoneuroendocrinology*. 19:641-656 (1994)
  - 40) Sharp PJ, Follett BK: *Neuroendocrinology*. 5:205-218 (1969)
  - 41) Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF, Jr., Reppert SM: *Neuron*. 19:1261-1269 (1997)
  - 42) Silver R, Witkovsky P, Horvath P, Alones V, Barnstable CJ, Lehman MN: *Cell Tissue Res*. 253:189-198 (1988)
  - 43) Siopes TD, Wilson WO: *Poult Sci*. 53:2035-2041 (1974)
  - 44) Stirling JA, Johnston JD, Cagampang FR, Morgan PJ, Castro MG, White MR, Davis JR, Loudon AS: *J Neuroendocrinol*. 13:147-157 (2001)
  - 45) Watanabe M, Yasuo S, Watanabe T, Yamamura T, Nakao N, Ebihara S, Yoshimura T: *Endocrinology*. 145:1546-1549 (2004)
  - 46) Williams LM, Morgan PJ, Hastings MH, Lawson W, Davidson G, Howell HE: *J Neuroendocrinol*. 1:315-320 (1989)
  - 47) Yamamoto K, Okano T, Fukada Y: *Neurosci Lett*. 313:13-16 (2001)
  - 48) Yasuo S, Watanabe M, Okabayashi N, Ebihara S, Yoshimura T: *Endocrinology*. 144:3742-3748 (2003)
  - 49) Yasuo S, Watanabe M, Tsukada A, Takagi T, Iigo M, Shimada K, Ebihara S, Yoshimura T: *Endocrinology*. 145:1612-1616
  - 50) Yoshimura T, Suzuki Y, Makino E, Suzuki T, Kuroiwa A, Matsuda Y, Namikawa T, Ebihara S: *Brain Res Mol Brain Res*. 78:207-215 (2000)
  - 51) Yoshimura T, Yasuo S, Watanabe M, Iigo M, Yamamura T, Hirunagi K, Ebihara S: *Nature*. 426:178-181 (2003)