

# 博士論文

メダカにおける受容体を介したメラトニンの機能に関する研究

2020年3月

長浜バイオ大学大学院 バイオサイエンス研究科  
バイオサイエンス専攻 バイオ科学技術研究領域

酒井 琴和

## 目次

序論	1
第一章 メダカに存在するメラトニン受容システムに関する解析	7
材料と方法	8
結果	27
考察	73
第二章 メダカのメラトニン受容体の機能に関する解析	78
緒言	79
材料と方法	80
結果	87
考察	99
謝辞	104
引用文献	105
論文目録	117

## 序論

メラトニンとは動物、植物、微生物に普遍的に存在する生理活性低分子化合物である。脊椎動物においてメラトニンの主要な産生部位は脳の一部である松果体と呼ばれる器官であるが、これ以外にも様々な臓器や組織において産生されることが知られている。セロトニンを基質としてメラトニンの前駆体である N-アセチルセロトニンを合成する *aralkylamine N-acetyltransferase*

(AANAT) は、光があたることにより構造が変化し酵素活性を失うため、血中に放出されるメラトニンは夜間に増加し、昼間に減少する (Gastel *et al.*, 1998)。さらに、AANAT の発現量自体も昼間に少なく夜間に上昇し、さらに恒暗条件下でも少なくとも数日間は血中メラトニン量の増減リズムは保たれていることから、メラトニンの存在量は光のみならず体内時計にも依存していることが示されている (Iigo *et al.*, 1997, Klein 2006, Ben-Moshe Livne *et al.*, 2016)。このように明暗周期と体内時計に依存する血中メラトニン量の増減リズムは、体中の組織に受容体を介してシグナルとして伝えられ、その制御下にある様々な分子の発現にリズムをもたせていると考えられている (Hardeland *et al.*, 2012, Kulczykowska *et al.*, 2010)。また、メラトニンの合成量は夜の長さや気温に比例して増加するため、メラトニンが伝達する日長情報は周囲の環境の季節変化を体内に伝えることにもなる。それゆえ、季節に伴うメラトニン合成量の変化は、季節繁殖を行う生物の概年リズムを同期させ、季節で変動する免疫や食欲、成長、生殖などの行動・生理的なイベントのタイミングを計る一因になると考えられている (Masuda *et al.*, 2003, Wood *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2015, Esteban *et al.*, 2013 Gwinner, 1996, Bentley, 2001)。

ヒトを含めた昼行性の哺乳類に対してメラトニンが眠気を誘発することが古くから知られており、現在ではメラトニンの受容体の特異的リガンドであるラメルテオンが睡眠薬として処方されている (Lieberman *et al.*, 1984, Dollins *et al.*, 1994, Zhdanova *et al.*, 2002, Srinivasan *et al.*, 2009)。哺乳類には睡眠系と覚醒系が存在し、これらは互いに抑制する関係にある。睡眠に関連するニューロンは睡眠活性ニューロンと睡眠促進ニューロンに分けられており、睡眠活性ニューロンは GABA や神経ペプチドにより活性化すると、睡眠系と相反する覚醒系を阻害して睡眠系へと移行させる。哺乳類では睡眠活性ニューロンが視索前野を含むいくつかの脳領域に存在することが報告されている。一

方、睡眠促進ニューロンは睡眠活性ニューロンを活性化させることで、間接的に睡眠系への移行に関与する。睡眠促進ニューロンを活性化させることが最終的に睡眠につながると考えられている (Bringmann H, 2018)。ヒトではメラトニンが深部体温を低下させることが証明されており、これも睡眠導入に関与する因子の一つと考えられる (Dawson *et al.*, 1996、 Van Den Heuvel *et al.*, 1997)。しかし、メラトニンが睡眠を誘導する詳細なメカニズムについての理解は十分ではない。

昼行性の魚類も哺乳類と同様にメラトニンの投与により睡眠時の行動パターンを示すことが報告されている。昼間は水中で活動するが夜になると砂底に潜る習性を持つベラ科のミツボシキュウセン (*Halichoeres trimaculatus*) にメラトニンを注射すると、明条件下でも水槽の底で横たわり、対照群のような遊泳行動を示さなかった (Hur *et al.*, 2012)。また、ゼブラフィッシュの稚魚にメラトニンを曝露したとき、従来の催眠鎮静薬と同様に運動が低下し

(Zhdanova *et al.*, 2001)、松果腺における主なメラトニン合成酵素である *aanat2* に変異をもつゼブラフィッシュは夜間の睡眠量が劇的に減少した

(Gandhi *et al.*, 2015)。このようにメラトニンが魚類に対しても睡眠誘発効果を示すことは明らかである。しかしながら魚類では睡眠促進ニューロンが同定されておらず、メラトニンによる睡眠誘導分子機構は未だ明らかになっていない (Bringmann H, 2018)。

メラトニンは夜行性の生物においてもその行動に影響を及ぼすことが報告されている。明期のはじめにメラトニンが投与されたジャンガリアンハムスターやラットは、睡眠の断片化や体温の上昇を示し、覚醒状態が誘発された

(Huber *et al.*, 1998)。また、ガマアンコウ科に属する夜行性の plainfin midshipman (*Porichthys notatus*) のオスでは、光によって抑制された求愛行動がメラトニンの投与によって回復する (Feng and Bass, 2016)。これらの知見から、メラトニンは昼行性、夜行性を問わず生物全般において夜に行われる生理的・行動的イベントにも関与していると考えられる。

睡眠導入作用と同様に哺乳類でよく知られているメラトニンの作用に、明暗周期と概日リズムの同調作用がある。概日リズムは視床下部に存在する視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus : SCN) において時計遺伝子の転写調節によって構成されるコア・ループに基づいており、睡眠系と覚醒系の切り替えのタ

イミングも概日リズムに制御されている。メラトニンは SCN に発現している受容体を介して、このコア・ループの調節にも関与すると考えられている (Benarroch, 2008)。摂食行動に概日リズムを示すイエスズメ (*Passer domesticus*) では、光周期を変化させた後の新たな明暗周期と摂食行動パターンの再同期時間がメラトニンの投与により短縮した (Abraham *et al.*, 2000)。また明暗周期を 8 時間前進させたラットでは、メラトニンの経口投与により暗期の活動時間帯と光周期の再同調にかかる時間が短くなることが報告されている (Hirai *et al.*, 2005)。

このように、メラトニンは、体内の概日リズムと外環境のずれを修正する役割があることが示されている。一方、土中生活を送るハダカデバネズミのメラトニン合成に関与する酵素群の発現量は著しく低いうえに、メラトニンの受容体をコードする遺伝子上に変異をもち、おそらくメラトニンシグナル伝達系は機能していないが、地表に出て明暗周期にさらされることにより概日リズムが維持されていることが示唆されている (Kim *et al.*, 2011)。また、C57BL/6J 系統のマウスではメラトニン合成の律速酵素である AANAT がノックダウンされた状態にあり、さらに AANAT によりセロトニンからつくられた N-アセチルセロトニンをメラトニンに変換する酵素である hydroxyindole O-methyltransferase をコードする遺伝子上に複数の変異が存在するため、結果的にメラトニンがつかられない (Roseboom *et al.*, 1998、Kasahara *et al.*, 2010)。それにもかかわらず、C57BL/6J マウスにおいても基本的な概日リズムは維持されている。このことから、メラトニンは概日リズムの形成そのものには関わっていないと考えられる (Valentinuzzi *et al.*, 1997)。

この他にも多様な生理作用へのメラトニンの関与が報告されている。メラトニンは発見当初から両生類や魚類において色素胞を凝集させ体色明化を引き起こすことが知られていたが、その後、代謝や食欲、血糖値の調節、血管新生、浸透圧の調節、抗がん、鬱、記憶形成など体で起こる様々な現象に関与していることが明らかにされてきた (Mühlbauer *et al.*, 2009、Hill *et al.*, 2009、Farez *et al.*, 2015、Esteban *et al.*, 2013、Taniguti *et al.*, 2018、Rawashdeh *et al.*, 2007、Peng *et al.*, 2017、服部, 2017)。また、メラトニンはそれ自体が活性酸素やフリーラジカルのスカベンジャーとして働き、活性酸素種による DNA や細胞の損傷を軽減させる効果が知られている (Reiter *et al.*, 2003)。

上記のようなメラトニンの多様な作用の多くは、メラトニン受容体を介して誘導される。メラトニン受容体 (MTNR) は七回膜貫通型の構造をとる G タンパク質共役型受容体ファミリーに属しており、メラトニンを受容して活性化すると抑制型の G タンパク質 (Gi) と共役し、アデニル酸シクラーゼに作用して cAMP 合成を負に制御する (Gaildrat *et al.*, 2002, Barrett *et al.*, 2003, Falcón *et al.*, 2007)。細胞内の cAMP 濃度が減少すると、cAMP 依存性プロテインキナーゼ A の活性が衰退し、その結果 cAMP 応答配列 (CRE: cyclic AMP response element) 結合タンパク (CREB) がリン酸化されず、CREB の転写活性が失われるため CRE の制御下にある遺伝子の転写活性が抑制される。したがって MTNR の活性化は、プロモーター領域に CRE をもつ遺伝子の転写調節に関して負の制御を行う。

MTNR はいくつかのサブタイプによって構成されるが、このサブタイプは生物種によって異なっている。硬骨魚類や爬虫類は *mtnr1a*, *mtnr1b*, *mtnr1c* そして *mtnr1a1.4* や *mtnr1a-like* とも表記される *mtnr1d* の 4 種類を有するが、鳥類は *mtnr1d* を除く 3 種類の *mtnr* サブタイプを有している。また哺乳類では *mtnr1c* および *mtnr1d* は見つかっておらず、*mtnr1a* (MT1) と *mtnr1b* (MT2) のみが存在している (Li *et al.*, 2013)。MTNR1a と MTNR1b が活性化すると cAMP 量が減少することが培養細胞を用いた実験によって確かめられているが、MTNR1d の機能については未だ明らかになっていない (Barrett *et al.*, 2003)。MTNR1d は 7 回膜貫通ドメインでは MTNR1a と非常に相同性が高いが、MTNR1a に比べて長い N 末端領域と、短い C 末端領域を持つ。MTNR1a、MTNR1b、MTNR1c ではほぼ同じ長さの N 末端領域と C 末端領域をもつことから、MTNR1d は他の受容体サブタイプとは異なる機能を有している可能性も存在する。

現在までに報告されている MTNR によって制御される生理機能についての知見は、MTNR ノックアウトマウスを用いた研究によるものが多い。例えば、メラトニンの受容体が発現していることがわかっているマウス脳の SCN に電極を取り付け、メラトニン进行处理すると、野生型のマウス脳では急激な神経発火の抑制が観察されることに對し、MTNR1a ノックアウトマウスでは、メラトニン処理による SCN 神経細胞の発火抑制は起こらないことが報告されている (Liu *et al.*, 1997)。また、メラトニン进行处理すると G タンパク質依存的な SCN

における神経発火の位相シフトが認められるが、これは野生株だけでなく MTNR1a ノックアウトマウスでも認められる (Dubocovich *et al.*, 2005)。SCN には MTNR1a とともに MTNR1b が発現していることから、メラトニンによる G タンパク質依存的な神経発火の位相シフトは MTNR1b によって制御されていることが示されている。このように、MTNR ノックアウトマウスを用いた実験で多くの知見が得られているが、生理学的、生化学的な実験が限定的なため、メラトニンの機能や各 MTNR を介した情報伝達機構などについては不明な点が多い。さらに、MTNR の機能についての知見が多数得られているマウスには MTNR1a と MTNR1b のみが存在しており、MTNR を介したメラトニンの機能についてはその全貌が明らかになったとは言いがたい。さらに、メラトニンは昼行性の生物を活発にさせ、夜行性の生き物に対して睡眠を誘導するように、その生物の生態によって、メラトニンは異なる生理機能を示す。よって、夜行性のマウスを用いた研究により得られた既存のメラトニンの生理機能に関する知見が昼行性の生物にも該当するかについては別途調べる必要がある。

前述したように、メラトニンの受容体には 4 種の MTNR が存在するが、それぞれのサブタイプが同一の生理機能を制御するのか、異なる生理機能を制御するのかについては明らかになっていない。このような疑問に答えるためには、4 種の MTNR が保存されている昼行性の硬骨魚類や爬虫類での研究が有用であろう。観賞魚として古くから親しまれているメダカ (*Oryzias latipes*) は、ダツ目メダカ科に属する、体長 3~4 cm 程の淡水魚で、小さい群れをなして流れのゆるい小川や水田に生息する。メダカは飼育が容易で、世代時間が 3-4 ヶ月と短いこと、さらに、卵が透明で体外受精を行うため発生の早い時期から観察できることから、遺伝学や発生生物学などの分野で用いられている。さらに、2007 年には全ゲノム配列が解読され、現在では、遺伝学が可能な脊椎動物のモデル生物として利用されている。メダカは昼行性で、4 種の MTNR を保持しており、かつ行動や生理機能に明確な概日リズムを示す。このことから、メダカは 4 種の MTNR を介したメラトニンの機能を研究する上では非常に有用な生物となるであろう。しかし、これまでメダカにおけるメラトニンの機能についての研究はほとんどなされていないのが現状である。

そこで、昼行性の硬骨魚類であるメダカを用いて、メダカにおけるメラトニンの生理機能についての知見を得ることを目的として研究を行った。本論文の第

一章では、メラトニンのメダカへの曝露実験や、メダカのメラトニン受容体（MTNR）の同定と解析などを通して、メラトニンが実際にメダカにおいて生理機能を有するかどうかについて解析を行った。さらに、第二章ではメラトニンが有する生理機能の詳細を明らかにするために、各 MTNR のノックアウトメダカを作製し、その表現型解析を行った。これらの結果を総合して、メラトニンがメダカにおいてどのような生理機能を有しており、その生理機能はどのようにして発現しているのかについても考察を行っている。



## 第一章

メダカに存在するメラトニン受容システムに関する解析

## 第一章 材料と方法

### 1) 実験動物

実験には、ヒメダカ (*Oryzias latipes*) の成魚およびそれらから採取した受精卵を用いた。メダカは水温  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、長日光周期 (14L10D: 14 時間明期、10 時間暗期) の条件下で飼育し、生のブラインシュリンプ (*Artemia salina*) の幼虫と市販の乾燥餌 (メダカのエサ 産卵繁殖用、キョーリン) を 1 日 2 回与えた。実験に応じて長日光周期または短日光周期 (10L14D: 10 時間明期、14 時間暗期) に 4 週間以上馴致した。発現量解析には、各時間帯で 6 匹以上のメダカ成魚 (3 か月齢以上、体長 2~3 cm) を使用した。明期の開始時刻を zeitgeber time (ZT) 0 として、成魚の脳および眼球のサンプリングは ZT3, 7, 11, 15, 19, 23 に、その他の組織については ZT7 および ZT19 に行った。胚は同日に得られた 20 個の受精卵を 1 群として、ZT7 および ZT19 に 3 群ずつサンプリングを行った。

### 2) メダカ成魚へのメラトニン曝露

10 L 容量の水槽にて、ヒメダカの成魚 (雌 8 匹、雄 3 匹) を短日光周期条件下で 30 日間飼育し、再び長日光周期条件下に戻すと同時に、メラトニンの曝露を開始した。水温は  $26^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  に維持し、餌は ZT1, 8, 12 に十分な量を与え、水は毎日 ZT9 に新しい汲み置き水と交換した。水の交換直後に終濃度が  $1 \mu\text{M}$  になるようにメラトニン (Wako) をエタノールに溶解した溶液を  $100 \mu\text{l}$  添加した。対照群には等量のエタノールのみを添加した。点灯時 (ZT0) から 30 分ごとに産卵個体数を確認した。採卵後の卵は新しい汲み置き水を用いてメラトニンやエタノールを加えず飼育し、孵化に要した日数を記録した。

対照群とメラトニン曝露群の産卵時刻に関して GraphPad Prism 5 を用いて F 検定および Mann Whitney test による有意差検定を行った。また、孵化にかかる日数は F 検定ののち Unpaired t test with Welch's correction による有意差検定を行った。

### 3) RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends) による MTNR1b および MTNR1c 全長配列の取得

#### 3-1) SMART (Switching Mechanism At 5'end of RNA Template) 法による RACE-Ready cDNA 合成

メダカから抽出した total RNA と SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) を用いて、User Manual に従い、RACE-Ready cDNA を合成した。

#### 3-2) 5'-RACE 用プライマー設計

NCBI に登録されている OIMTNR1b 及び OIMTNR1c の推定塩基配列 (XM\_004076314.1, XM\_004073511.1) を参考に、*mtnr1b* および *mtnr1c* の 5' 側の配列を増幅するためのプライマーを作製した。

#### 【*mtnr1b* および *mtnr1c* の 5'-RACE プライマー】

---

##### *mtnr1b*\_RACE

F primer (30 mer) : AATGTGTTTGTGGTGAGCCTGGCATTGCT

R1 primer (30 mer) : TCCTACACGGTGGCTGTAGTGGTGGTTCAC

R2 primer (30 mer) : TATGCTCTCTTTCATGACGGATGGGCTCTG

---

##### *mtnr1c*\_RACE

F primer (30 mer) : AACATCTTCGTGGTGAGCTTGTCTGTGGCA

R1 primer (30 mer) : GTCCTTGTCTTATTTGCTGTGTGCTGGGCG

R2 primer (30 mer) : TTCAACATCACTGCCATTGCCATCAACCGC

---

#### 3-3) 5'-RACE による未知配列の増幅

設計した 5'-RACE プライマー (R1) と SMARTer RACE cDNA Amplification Kit に付属の universal primer および KOD Plus Neo (TOYOBO) を用いて

[94°C2分→(98°C10秒、アニーリング30秒、68°C3分) X25]の条件で RACE PCR を行った。各アニーリング温度は *mtnr1b*: 65°C、*mtnr1c*: 63°Cとした。1 度目の RACE PCR 終了後、得られた増幅産物 (RACE 産物) を滅菌水で 50 倍に希釈し、nested PCR の鋳型とした。nested PCR は SMARTer RACE cDNA Amplification Kit に付属の nested primer および R1 よりも 5'側に設計した 5'-RACE プライマー (R2) と KOD Plus Neo (TOYOBO) を用いて[94°C2分→(98°C10秒、65°C30秒、68°C1.5分) X25]の条件で行った。増幅産物は rTaq DNA Polymerase (TOYOBO) を用いてアデニン付加を行い、pGEM-T Easy vector (Promega) に TA クローニングし、シーケンス解析を行った。

#### 4) 脊椎動物の *mtnr* サブタイプの系統樹解析とシンテニーの比較

Ensembl genome browser (<http://asia.ensembl.org/index.html>) および National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) に登録されている脊椎動物の MTNR のアミノ酸配列を収集した。データ配列の整理には MEGA 7.0.14 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, ver.7.0.14) を使用し、Neighbor-joining 法により系統樹を作成した。ブートストラップサンプリングは 1,000 回行った。

また、Ensembl に登録されているメダカ: Medaka (*Oryzias latipes*)、アマゾンモリー: Amazon molly (*Poecilia formosa*)、プラティフィッシュ: Platyfish (*Xiphophorus maculatus*)、ティラピア: Tilapia (*Oreochromis niloticus*)、トゲウオ: Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*)、ミドリフグ: Tetraodon (*Tetraodon nigroviridis*)、スポットテッドガー: Spotted gar (*Lepisosteus oculatus*)、スッポン: Softshell turtle (*Pelodiscus sinensis*)、アノールトカゲ: Anole lizard (*Anolis carolinensis*)、ニワトリ: Chicken (*Gallus gallus*) およびヒト: Human (*Homo sapiens*) のゲノム情報から、Genomicus 98.01 (Louis *et al.*, 2013) を用いて 4 種の *mtnr* のシンテニー領域を比較した。

## 5) メダカ MTNR とメラトニンの親和性解析

4 種のメダカ MTNR とメラトニンの親和性を調べるために、MTNR を恒常的に発現する細胞を作製し、レポーターアッセイを行った。

### 5-1) メダカ MTNR 遺伝子発現ベクターの作製

NCBI のデータベースに登録されているメダカ *mtnr* の塩基配列 (*mtnr1a*: XM\_004065955.1, *mtnr1b*: LC032111.1, *mtnr1c*: LC036562.1, *mtnr1d*: XM\_004073612.2) を参考に、*mtnr* の ORF を増幅するためのプライマーを作製した。forward primer の 5' 側にはコザック配列 (ACC) を付加した。メダカの脳由来の cDNA を鋳型に、KOD Plus Neo (TOYOBO) を用いて [94°C 2 分 → (98°C 10 秒、アニーリング 30 秒、68°C 1 分) X40 ] の条件で PCR を行うことにより *mtnr* の ORF を増幅した。各 *mtnr* のアニーリング温度は *mtnr1a*: 61°C, *mtnr1b*: 60°C, *mtnr1c*: 58°C, *mtnr1alike* (*1d*) : 61°C とした。増幅産物は rTaq DNA Polymerase (TOYOBO) を用いてアデニン付加を行い、pGEM-T Easy vector (Promega) に TA クローニングした。配列を確認後、*EcoR* I (TaKaRa) による制限酵素処理を行い、T4 DNA Ligase (Promega) を用いて pcDNA3.1(+) vector (invitrogen) に組み込んだ。再度配列を確認後、これらを MTNR 発現ベクターと名付けた。

#### 【メダカ *mtnr* のクローニングに用いたプライマーセット】

---

##### *mtnr1a*

F primer (30 mer) : ACCATGCTTCAAAAATGGGTCTCACCTGAAC

R primer (30 mer) : TCAGACGGACTCCACTTTGACCTGGTTATT

---

##### *mtnr1b*

F primer (30 mer) : ACCATGCCGGACGCAATAACCCTCATAAAG

R primer (30 mer) : TCATTCCTTGTGGTGTGCGATCTCTCACAGA

---

##### *mtnr1c*

F primer (30 mer) : ACCATGGATTTGGAGGTGAAGGATGTGAAC

R primer (30 mer) : AACACAATGTAGCAGAGATCAATGTATAA

---

---

< *mtnr1d* >

F primer (30 mer) : ACCATGCTGAGCGGACAGACCCTCCGCGGC

R primer (30 mer) : TCAGCAGTGGAACCTTACAGATGATCAGGAC

---

## 5-2) メダカ MTNR 恒常発現細胞の作製

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) 肝臓由来の細胞 (Hepa-E1 細胞) に MTNR 発現ベクターを恒常的に導入した。

細胞に各 MTNR 及び CRE 応答性ホタルルシフェラーゼ遺伝子 (*CRE-luc*) を恒常的に発現させるために、環状の MTNR 発現ベクター及び pCRE-luc Vector (Pathway Profiling Luciferase System: Promega) を鋳型にして各ベクターのプロモーターから ORF を含む領域までを、KOD Plus Neo を用いて[94°C 2分→(98°C10秒、48°C30秒、68°C4分) X40]の条件で PCR を行うことにより直鎖状に増幅した。発現ベクターの増幅には fCMV primer 及び rNeo<sup>r</sup> primer を、レポーターベクターの増幅には fGV2 primer 及び r*Bam*H I primer を使用した。増幅産物はエタノール沈殿後、ナノドロップで濃度を測定した。

### 【直鎖化のための増幅に用いたプライマーセット】

---

< expression vector >

fCMV primer (25 mer) : GACATTGATTATTGACTAGTTATTA

rNeo<sup>r</sup> primer (24 mer) : TAAGATACATTGATGAGTTTGGAC

---

< reporter vector >

fGV2 primer (25 mer) : CGATAGTACTAACATACGCTCTCCA

r*Bam*H I primer (23 mer) : GGATCCTTATCGATTTTACCACA

---

Hepa-E1 細胞の継代培養には、10 %のウシ胎児血清を含む E-RDF Medium (KYOKUTO) (以下 10 % FCS RDF) を用いた。細胞は 30°Cに設定したインキュベーターで培養した。

Hepa-E1 細胞が 70 %コンフルエントの 9 cm ディッシュを 2 ml のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 2 度洗浄し、トリプシン 1 ml を加え細胞が遊離するま

で 37°C に設定した CO<sub>2</sub> インキュベーターで保温した。10 % FCS RDF を 5 ml 加え懸濁後、調整後に室温で 15 分静置したトランスフェクション液を全量加えた。30°C のインキュベーターにて 5 時間培養後、培養液 4 ml を加え、再度 24 時間培養した。

#### 【MTNR 発現ベクターの恒常的トランスフェクション液の組成】

MTNR expression vector	1500 ng
Reporter vector (pCRE-luc)	1500 ng
無血清フェノールレッドフリーDMEM	1 ml
TransIT-X2® (Mirus Bio)	9 µl

MTNR 発現ベクターおよび pCRE-luc レポーターベクターのトランスフェクションを行ったディッシュに G418 二硫酸塩溶液 (nacalai tesque) を終濃度 400 µg/ml になるように加え、以後数日おきに G418 の濃度を減らして培養することで、カナマイシン耐性遺伝子を含む MTNR 発現ベクターが組み込まれた細胞のみを選抜した。

薬剤選抜後、単一の細胞由来の細胞のコロニーを 96 穴プレートへ移し、培養した。クローン化した細胞は培養液を除き、5 % のウシ胎児血清を含むフェノールレッドフリー Dulbecco's Modified Eagle's Medium を活性炭処理した培地 (以下活性炭処理 5 % FCS DMEM) 200 µl に懸濁後、別の 2 穴に 90 µl ずつ分注した。一方にはエタノールに溶解したメラトニン (Wako) を終濃度が  $1 \times 10^{-7}$  M になるよう加え、30°C のインキュベーターにて 24 時間培養した。このとき対照群としてエタノールをもう一方に等量添加した。培養後、Steady-Glo® Luciferase Assay System (Promega) のルシフェリン溶液を 25 µl 加え 10 分間静置し、全量を測定用 96 穴プレートに移した。ルミノメーター (Luminescencer-JNR II:ATTO) に設置し、5 分後に 10 秒間の積算発光強度を測定した。エタノール添加群と比較したときメラトニン添加群で発光強度の減少が認められたクローンを MTNR 発現細胞とし、培養を続けた。

### 5-3) メダカ MTNR 発現細胞を用いたレポーターアッセイ

MTNR が活性化すると cAMP 合成量が減少するため、CRE 制御下にある遺伝子の発現量が減少する。そこで MTNR の活性を見やすくするために、細胞内 cAMP 濃度を高める作用が知られている forskolin (FSK) 共存下でのレポーターアッセイを行った。細胞添加後の FSK 終濃度が  $6.25 \times 10^{-5}$  M になるよう、FSK 入り活性炭処理 5 % FCS DMEM を用いてメラトニンを 1/4 ずつ段階希釈し、8 段階のメラトニン希釈列を作製した。1 つの濃度のメラトニン希釈液につき測定用 96 穴プレートの 3 穴に 10  $\mu$ l ずつ分注した。

9 cm ディッシュに 80 %コンフルエントになるまで培養した MTNR 発現細胞をトリプシン処理後、活性炭処理 5 % FCS DMEM を 9 ml 加え懸濁し、メラトニン希釈列を分注した測定用 96 穴プレートに 90  $\mu$ l ずつ加えた。30°C のインキュベーターで 24 時間培養後、25  $\mu$ l の Steady-Glo® Luciferase を加えて室温で 10 分間静置し、ルミノメーターに設置してから 5 分後に 10 秒間の積算発光強度を測定した。ブランクを除いた測定値を用いて GraphPad Prism 5 によりメラトニンの濃度応答曲線を作成し、EC<sub>50</sub> (50% Effective Concentration) 値を求めた。MTNR ごとに少なくとも 3 回の測定を行った。

MTNR1c に関しては恒常発現細胞が取得できなかったため、測定のたびに、9 cm ディッシュに 80 %コンフルエントになるまで培養した Hepa-E1 細胞に発現ベクターとレポーターベクターを一過的に導入し、測定を行う方法を用いた。6 ml の細胞入り RDF 培地の入った 9 cm ディッシュに、調整後に室温で 15 分間静置したトランスフェクション液を加え 24 時間培養した。他の恒常発現細胞と同様に、FSK 混合メラトニン希釈列を分注した 96 穴プレートへ細胞の播種を行い、30°C のインキュベーターで 24 時間培養し、発光量の測定を行った。

#### 【MTNR1c 発現ベクターの一過的トランスフェクション液の組成】

---

MTNR1c expression vector	500 ng
Reporter vector (pCRE-luc)	5000 ng
無血清フェノールレッドフリーDMEM	500 $\mu$ l
TransIT-X2® (Mirus Bio)	16.5 $\mu$ l

---



## 6) total RNA の抽出と cDNA 合成

魚はサンプリングの直前に 0.01 % p-アミノ安息香酸エチル/エタノール溶液を用いて麻酔した。サンプリング後の臓器は 500  $\mu$ l の Sepasol®-RNA I Super G (nacalai tesque) を加えた 1.5 ml マイクロチューブ内でホモジナイズし、-80°C で凍結保存した。

室温で融解させたサンプルの入ったマイクロチューブに、さらに 500  $\mu$ l の Sepasol を加え混和し 5 分間静置後、200  $\mu$ l のクロロホルムを加え転倒混和し、3 分間静置した。13,500 rpm で 15 分間遠心分離後の上清を別のマイクロチューブに移し、等量のイソプロピルアルコールを加え転倒混和し 5 分間静置した。13,500 rpm で 15 分間遠心分離後に上清を除去し、1 ml の 70 %エタノールを加え 13,500 rpm で 5 分間遠心分離し上清を除去した。風乾後、DNase/ RNase-free water に溶解した。抽出した total RNA は Nano-drop により核酸濃度を測定し、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて記載された方法に従って逆転写反応を行い、cDNA を合成した。得られた cDNA サンプルは-20°C で保存した。

## 7) 定量的 real-time PCR による目的遺伝子の発現量の定量

メダカの組織から抽出した total RNA 中に含まれる目的遺伝子の mRNA 発現量を定量するため、cDNA を鋳型として real-time PCR を行った。酵素には SsoAdvanced Universal SYBR® Green Supermix (Bio-Rad) を用いた。反応は[98°C 2 分→(98°C 2 秒、60°C 5 秒) X40→65°C から 95°C まで 10 秒ごとに 0.2°C ずつ上昇]の条件で行った。PCR と蛍光検出には MiniOpticon Real-Time PCR System (BIO RAD) を用いた。測定値から total RNA 1  $\mu$ g あたりの目的遺伝子の mRNA コピー数を算出し、時間帯ごとの発現量について有意差の有無を調べるために Tukey's multiple comparison test または t-test を行った。

【定量的 real-time PCR に用いたプライマーセット】

---

*aanat1a*

F primer (20 mer) : TGGCCTTCATCATTTGGCTCT

R primer (20 mer) : GATGGAGCCTTTTCCCTGCT

---

*aanat1b*

F primer (21 mer) : GCCATCAGCGTCTTTGAAATC

R primer (20 mer) : CCTCGAACCAGCCCATAGAG

---

*aanat2*

F primer (20 mer) : CCTGGGTTGGTTTGAAGAGG

R primer (20 mer) : GGAGTGTCTGGGACATGCTG

---

*mtnr1a*

F primer (22 mer) : AGCGTATACAATCGCAGTGGTG

R primer (20 mer) : TTGGTCGGTTGTCTGGTTTG

---

*mtnr1b*

F primer (25 mer) : CGGCGTAAAGTAAAGACTGAAGAAA

R primer (19 mer) : CAGATGGCGAACAGCACAA

---

*mtnr1c*

F primer (20 mer) : GCTGCCTCAATGCCATCATA

R primer (16 mer) : CGGCACGCAAAGAGCA

---

*mtnr1d*

F primer (18 mer) : GGCACCTTCCGCAACTGA

R primer (18 mer) : CCTGTCGGCGTGGAGTTG

---

*rora*

F primer (24 mer) : CTCTGGCTTCTTTCCTTACTGCTC

R primer (22 mer) : GTGCGACTTTGAGATGTTCTGG

---

*rord1*

F primer (23 mer) : TGACGTCCAGAAGGTTCAAAAGT

R primer (24 mer) : TCTCCTCAGACGCTCCTTTATTCT

---

## 8) メダカの retinoic acid receptor-related orphan receptor (ROR) とメラトニンの親和性解析

核内受容体は RXR とヘテロ二量体を形成するため (Carlberg *et al.*, 1994)、正確に ROR とメラトニンの親和性を評価するためには、RXR がメラトニンの影響を受けないような ROR の活性測定系が必要であった。そこでメダカ ROR のヒンジドメインからリガンド結合ドメイン (RORa : Pro-Gly-Glu から終止コドンまで 172-519 番目のアミノ酸、RORd1 : Gln-Lys-His から終止コドンまで 98-473 番目のアミノ酸) と酵母の GAL4 転写因子の DNA 結合ドメイン (1-161 番目のアミノ酸) をもつキメラタンパク質を発現するベクターを作製し、このキメラタンパク質のもつレポーター遺伝子の転写活性能力から、メダカの RORa と RORd1a はメラトニンに対する機能的な受容体であるかどうかを調べた。

### 8-1) メダカ RORLBD-GAL4DBD キメラタンパク発現ベクターの作製

pBIND vector (CheckMate mammalian two-hybrid system, Promega) の酵母 Gal4 転写因子のリガンド結合ドメインをコードする領域を、T7 プライマーおよび T3 プライマーを用いた PCR によって増幅した。増幅産物を pGEM-T Easy ベクター (Promega) にクローニング後、*NotI* で制限酵素処理を行い、得られた断片を pcDNA3.1 (+) plasmid vector の *NotI* 部位にサブクローニングした。作製したベクターは、pcDNA3.1 (+) -GAL4DBD vector と名付けた。

In-Fusion による発現ベクターへのクローニングを行うために、ROR のヒンジドメイン-リガンド結合ドメインから終止コドンまでの配列の両側の末端に、pcDNA3.1 (+) -GAL4DBD vector の *XbaI* 制限酵素サイトの断面の 15 bp が付加されるように、Ensembl genome browser に登録されている配列 (*rora*: ENSORLG00000007645, *rord1*: ENSORLG00000003765) を参考に以下のプライマーを設計した。メダカの眼球由来の cDNA を鋳型に、KOD Plus Neo を用いて [94°C 2 分 → (98°C 10 秒、アニーリング 30 秒、68°C 1.5 分) X40] の条件で PCR を行った。各アニーリング温度は *rora*: 50°C、*rord1*: 48°C とした。増幅産物は *XbaI* で制限酵素処理した pcDNA3.1 (+) -GAL4DBD vector に、In-Fusion® HD Cloning Kit (Takara) を用いて組み込んだ。

### 【メダカ ROR のリガンド結合ドメインの増幅に用いたプライマーセット】

#### *rora*LBD

F primer (30 mer) : GTTGATATCATCTAGGCCCGGAGAGGCGGA

R primer (30 mer) : AATAGGGCCCTCTAGCTACCCGTCAACGGG

#### *rord*LBD

F primer (30 mer) : GTTGATATCATCTAGCCAGAAACACCGGCA

R primer (30 mer) : AATAGGGCCCTCTAGTTAGCCCTCTGTGGA

### 8-2) メダカ ROR 恒常発現細胞の作製

発現ベクターとして6-1)で作成した RORLBD-GAL4DBD キメラベクターを、レポーターベクターとして TATA ボックスの上流に 5 つの GAL4 結合部位をもち、その制御下にルシフェラーゼ遺伝子を含む pG5luc (CheckMate mammalian two-hybrid system, Promega) を用いた。

ROR 発現細胞のホストとして、ヒト胎児腎臓由来の HEK293 細胞を 9 cm ディッシュに播種した。培養液として、5%のウシ胎児血清を含むフェノールレッドフリー-Dulbecco's Modified Eagle's Medium (以降 5% FCS DMEM) を用いて、37°Cの CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。細胞が 80%コンフルエントになったところで、RORLBD-GAL4DBD キメラタンパク質発現ベクター(1500 ng) および pG5luc (1500 ng) を、X-tremeGENE 9 DNA Transfection Reagent (Roche) を用いてトランスフェクションした。24 時間後から RORLBD-GAL4DBD キメラベクターが導入された細胞を G418 で薬剤選抜した。薬剤選抜後、単一の細胞由来のコロニーを 96 穴プレートへ移し、培養した。25  $\mu$ l のルシフェリン溶液を加えた際に発光強度の高い細胞を選択した。

### 8-3) メダカ ROR 発現細胞を用いたレポーターアッセイ

RORLBD-GAL4DBD キメラタンパク質発現細胞を、9 cm ディッシュに 80%コンフルエントになるまで培養した。トリプシン処理後、活性炭処理 5% FCS DMEM を 9 ml 加え懸濁し、測定用 96 穴プレートに 90  $\mu$ l ずつ加えた。そこに

活性炭処理 5 % FCS DMEM で希釈した 100  $\mu\text{M}$  のメラトニンまたは all-trans retinoic acid を 3 穴に 10  $\mu\text{l}$  ずつ加え（終濃度 10  $\mu\text{M}$ ）、対照群として別の 3 穴にエタノールの活性炭処理 5 % FCS DMEM 希釈液を加えた。37°C のインキュベーターで 24 時間培養後、25  $\mu\text{l}$  の Steady-Glo® Luciferase Assay System のルシフェリン溶液を加えて室温で 10 分間静置し、ルミノメーターに設置してから 5 分後に 10 秒間の積算発光強度を測定した。測定は少なくとも 3 回行った。

## 9) メダカ MTNR 抗血清を用いたメダカの各組織における発現局在部位解析

ヒメダカの脳、眼球、鰓、心臓、腎臓、脾臓、腸、卵巣、精巣における 4 種の MTNR の発現局在を調べた。ブロッキングおよび二次抗体からアビジン・ビオチン標識酵素複合体 (ABC) による増感まで、VECTASTAIN® ABC KIT (VECTOR LABORATORIES) を用いた。発色には ImmPACT DAB Substrate (VECTOR LABORATORIES) を用いた。

### 9-1) メダカ MTNR 抗血清のサブタイプ特異性の確認

それぞれの抗体にサブタイプ特異性があることを確認するために、メダカ MTNR 発現ベクターまたは pcDNA3.1 ベクターを HEK293 細胞に一過的にトランスフェクションし、4 種のメダカ MTNR 抗血清 (Cosmo Bio Co. Ltd. に委託して作製、免疫動物にはウサギが使用された) を用いて免疫染色を行った。抗原ペプチド配列として、各メダカ MTNR の中でサブタイプ間の特異性の高い、C 末端または N 末端近傍の配列を選択した。また、キャリアタンパクとの結合にシステイン側鎖を使用するため、抗原ペプチド配列の末端にシステインを導入した。

#### 【メダカ MTNR 抗血清作製のために設計した抗原ペプチド配列】

antigen	position	amino acid sequence
MTNR1a	329-347	C+KSKPSPLMTN>NNQVKVESV
MTNR1b	329-347	C+TETSRAATDGRSMRSKQSL
MTNR1c	332-349	C+KSKPSPAVTNNNNVAEINV
MTNR1d	17-32	DPRHLPQLMPLEDHEA+C

9 cm ディッシュの底にカバーガラスを重ねないように敷き詰め、そこに 9 cm ディッシュに 70 %コンフルエント分の HEK293 細胞を懸濁した 6 ml の DMEM 培地と、室温で 15 分間静置したトランスフェクション液を加え、37°C で培養した。

**【MTNR 発現ベクターのトランスフェクション液の組成】**

MTNR expression vector	3000 ng
無血清フェノールレッドフリーDMEM	1 ml
TransIT-X2® (Mirus Bio)	9 µl

24 時間後、細胞が張り付いたカバーガラスを 30 分間ブアン氏液に浸け、固定を行った。洗浄のためガラスディッシュ内で PBS に 5 分間浸漬する操作を 3 度行い、以降は次の表の順序で操作を行った。内因性ペルオキシダーゼを失活させるために 0.3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/MeOH に浸漬した。ブロッキング後は一次抗体としてメダカ MTNR 抗血清を 1% BSA/PBS で 5000 倍に希釈したものを細胞面にのせ、4°C で一晩反応させた。各工程後には PBS (NaCl 4 g, KCl 0.1 g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O 1.45 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 g, total vol. 500 ml、オートクレーブ滅菌) を用いて、すすぎおよび 5 分間の浸漬を行った。DAB 染色後は脱水処理を行い、キシレンに置換後、スライドガラス状に封入剤 (MGK-S, 松波硝子工業) をたらし、細胞面を内側にしてカバーガラスをのせ封入した。

**【固定後の MTNR 発現培養細胞の免疫組織化学染色操作】**

試薬	温度	処理時間
0.3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /MeOH	RT	30 min
蒸留水	RT	5 min
蒸留水	RT	5 min
蒸留水	RT	5 min
PBS	RT	5 min
ブロッキング用ヤギ血清	RT	15 min
PBS	RT	5 min
X5000 メダカ MTNR 抗体	4°C	一晩
PBS	RT	5 min
二次抗体	RT	60 min
PBS	RT	5 min
ABC 試薬	RT	60 min
PBS	RT	5 min

DAB	RT	4 min
蒸留水	RT	5 min
90 %エタノール	RT	5 min
100 %エタノール I	RT	5 min
100 %エタノール II	RT	5 min
キシレン I	RT	10 min
キシレン II	RT	10 min

---

## 9-2) 組織のサンプリングと固定と保存

成熟したヒメダカを  $26^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  の水温で短日光周期（10 時間明期、14 時間暗期）に 4 週間以上馴致した。ZT19 にサンプリングを行うため、0.01 % p-アミノ安息香酸エチル/エタノール溶液を用いて麻酔した。サンプリング後の臓器は固定のため、臓器の体積の 30 倍以上の量のブアン氏液（飽和ピクリン酸水溶液：ホルマリン：酢酸=15：5：1, 用時調整）に直ちに浸漬した。室温で 24 時間浸漬後、組織を 70 %エタノールで 1 度洗浄し、再び使用するまで 70 %エタノールに浸漬したまま  $4^{\circ}\text{C}$  で保存した。



### 9-3) パラフィン包埋と薄切

組織の脱水・脱脂のためにエタノールに置換した。中間剤にはレモゾール (Wako) を用いた。パラフィン浸透処理後、新しいパラフィンに包埋した。

#### 【パラフィン包埋に至るまでの操作】

置換した試薬	温度	浸漬時間
70%エタノール	RT	20 min
90 %エタノール	RT	20 min
100 %エタノール	RT	20 min
100 %エタノール	RT	20 min
100 %エタノール	RT	20 min
レモゾール	RT	すぐ
レモゾール	RT	5 min
レモゾール	RT	5 min
パラフィン	63°C	15 min
パラフィン	63°C	15 min
パラフィン	63°C	15 min

適当な大きさにトリミングした組織入りパラフィンブロックを木片につけ、マイクローム (LEICA, RM2235) で薄切した。少量の水をのせたスライドガラス上に得られた切片をのせ、40°Cのホットプレート上でこれを伸展させた。十分に水を抜き、ホットプレート上で乾燥させた。

#### 9-4) 脱パラフィン・脱キシレン・浸水処理

組織の染色を行う前処理として、キシレンでパラフィンを溶かし、浸水処理を行った。染色バスケットに組織つきスライドガラスを並べ、各試薬が入った染色槽に以下の順番で浸漬した。

##### 【脱パラフィン・脱キシレン・浸水処理】

染色槽	温度	浸漬時間
キシレン I	RT	10 min
キシレン II	RT	5 min
キシレン III	RT	5 min
100 %エタノール I	RT	5 min
100 %エタノール II	RT	5 min
100 %エタノール III	RT	5 min
90 %エタノール	RT	5 min
70 %エタノール	RT	5 min
蒸留水 I	RT	2 min
蒸留水 II	RT	2 min

#### 9-5) 免疫組織化学染色

脱パラフィン処理後、下記の表の順序で操作を行った。内因性ペルオキシダーゼを失活させるために 0.3 %  $H_2O_2$ /MeOH に浸漬した。ブロッキング後は一次抗体としてメダカ MTNR 抗血清を 1 % BSA/PBS で 5000 倍に希釈したものを細胞面にのせ、4°Cで一晩反応させた。各工程後には PBS を用いて、すすぎおよび 5 分間の浸漬を行った。DAB 染色後は脱水処理を行い、キシレンに置換後、組織面に封入剤をたらし、カバーガラスをのせ封入した。

【メダカ組織の免疫組織化学染色の操作】

試薬	温度	処理時間
0.3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /MeOH	RT	30 min
蒸留水	RT	2 min
蒸留水	RT	2 min
蒸留水	RT	2 min
PBS	RT	5 min
ブロッキング用ヤギ血清	RT	15 min
PBS	RT	5 min
X5000 メダカ MTNR 抗体	4℃	一晚
PBS	RT	5 min
二次抗体	RT	60 min
PBS	RT	5 min
ABC 試薬	RT	60 min
PBS	RT	5 min
DAB	RT	4 min
蒸留水	RT	5 min
80 %エタノール	RT	30 sec
90 %エタノール	RT	30 sec
95 %エタノール	RT	30 sec
100 %エタノール I	RT	1 min
100 %エタノール II	RT	5 min
100 %エタノール III	RT	5 min
キシレン I	RT	5 min
キシレン II	RT	5 min
キシレン III	RT	5 min

## 9-6) ヘマトキシリン・エオシン染色 (HE 染色)

免疫染色を行った組織の隣接切片について、脱パラフィン後に下記の表の順序で HE 染色を行った。カラッチヘマトキシリン液 (2X) (Wako) による染色後、発色のために流水 (水道水) に 20 分間晒した。0.5 %エオシン Y・エタノール溶液 (Wako) による染色後は免疫染色時と同様に脱水処理を行い、キシレンに置換後、組織面に封入剤をたらし、カバーガラスをのせ封入した。

### 【HE 染色操作】

試薬	温度	処理時間
カラッチヘマトキシリン液 (2X)	RT	10 min
流水 (水道水)	30°C	40 min
0.5 %エオシン Y・エタノール溶液	RT	5 min
80 %エタノール	RT	30 sec
90 %エタノール	RT	30 sec
95 %エタノール	RT	30 sec
100 %エタノール I	RT	1 min
100 %エタノール II	RT	5 min
100 %エタノール III	RT	5 min
キシレン I	RT	5 min
キシレン II	RT	5 min
キシレン III	RT	5 min

## 第一章 結果

### 1) メダカ成魚へのメラトニン曝露

まず、メラトニンがメダカに対して何らかの生理活性を有するかどうかを調べることにした。メダカは短日光周期から長日光周期に切り替わって2週間後程度で繁殖行動に移り、産卵時期は明期が始まる直前であることが知られている。そこで、短日光周期から長日光周期に切り替えて飼育したメダカに終濃度  $1 \mu\text{M}$  のメラトニンまたはエタノールを処理して、産卵時期について調べた。その結果、対照群ではこれまで知られていたとおり点灯直後に産卵する個体が最も多かったが、メラトニン曝露群では点灯開始から2時間以上経過しても産卵する個体がみられ、産卵時間が後方にシフトする現象が認められた (Fig. 1A)。このようなメラトニン曝露による産卵時期の後方シフトが有意であることを証明するため F 検定を行ったところ、メラトニン曝露群と対照群の産卵時間は不等分散しており (F value: 2.273)、産卵のタイミングはメラトニン曝露群と対照群の間で有意に異なることが示された (Mann Whitney test, P value: 0.0030)。一方、長日光周期に切り替えてからの産卵開始日数および産卵個体数については、二群間で差異は認められなかった (Fig. 1B)。また、各個体が産んだ卵の数についても、メラトニン曝露による影響は認められなかった (Fig. 1C)。次に、胚が孵化までに要する時間についてメラトニン曝露群と対照群で比較したところ、胚が孵化までに要する時間の分布の形状に両群で有意な差は認められないものの (F value: 1.184)、平均日数で見るとメラトニン曝露群は  $13.8 \pm 0.158$  日、対照群は  $14.4 \pm 0.163$  日であり、メラトニン曝露群の方が胚の孵化に要する時間が有意に短かった (t-test, P value: 0.008175) (Fig. 1D)。

メダカへのメラトニンの曝露実験の結果、メダカの生殖腺の発達へのメラトニンの関与は認められなかったが、メラトニン曝露群で産卵時間がばらついたことから、メラトニンがメダカの産卵リズムを攪乱させることが示唆された。

## 2) 5'-RACE によるメダカ *mtnr1b* およびメダカ *mtnr1c* 配列の決定

曝露実験で示されたようなメダカに対するメラトニンの生理機能は、メラトニン受容体を介して行われている可能性が考えられる。そこで、メラトニンの生理機構に対する分子知見を得るために、脊椎動物においてメラトニンの受容体である MTNR について調べることにした。

序論にも示したが、硬骨魚類には4種の MTNR サブタイプが存在している。そこで、データベースに登録されている各 MTNR サブタイプの配列を解析したところ、*mtnr1a* および *mtnr1d* については全長配列が得られたが、*mtnr1b* および *mtnr1c* については5'側の配列が欠落した部分配列のみが得られた。そこで、5'-RACE により、メダカの *mtnr1b* および *mtnr1c* について、5'側の配列を解析したところ、*mtnr1b* については推定開始コドンから 309 bp の配列が、*mtnr1c* については 216 bp の配列が得られた (Fig. 2、Fig. 3)。得られた配列を含めた推定 ORF をアミノ酸配列に変換し、5種の硬骨魚類間で *mtnr* 配列と比較したところ、*mtnr1b* の相同性は 91.2~96.9%、*mtnr1c* の相同性は 88.8~95.4% となり、既知の *mtnr1a* (91.9~95.4%)、*mtnr1d* (78.8~93.1%) と同様に高い相同性を示した (Fig. 4)。

また、得られた配列情報から作製したフォワードプライマーを用いて行った *mtnr* の全長取得のための PCR では、5'-RACE で得られた配列と相違ない配列を5'側にもつ *mtnr* がクローニングされた。

## 3) 4種の MTNR 遺伝子の系統樹解析とシンテニー解析

メダカのもつ4種の *mtnr* は他の生物において保存されている *mtnr* のオースログであることを確かめるため、系統樹解析とシンテニー解析を行った。

MTNR のアミノ酸配列に基づく系統樹解析の結果、まず4つのクレードができた (Fig. 5)。*mtnr1a* および *mtnr1d* の祖先と *mtnr1b* および *mtnr1c* の祖先が共通祖先から分岐した後、4つの *mtnr* に分岐していた。

シンテニー解析の結果、脊椎動物で *mtnr* の周囲の遺伝子の位置関係は保存されていた (Fig. 6)。ヒトやニワトリ、爬虫類を含め、調べた生物のほとん

どの種で *fat1a* と *cyp4v8* のホモログの間に *mtnr1a* が存在していたが、全骨魚に属するスポットテッドガーではこの 2 つの遺伝子の間に *mtnr1a* と類似する配列は見当たらなかった (Fig. 6A)。 *mtnr1b* の周辺の遺伝子の種類は片側が硬骨魚類とその他の脊椎動物で異なったが、 *mtnr1b* が *fat3* のホモログの隣に存在することは共通であり、 *fat3* 側のシンテニーは調べた種全部で保存されていた (Fig. 6B)。一方、 *mtnr1c* の周辺の遺伝子の種類は硬骨魚類とその他の脊椎動物種で異なったが、ミドリフグを除いて、いずれの種も *mtnr1c* が *vma21* のホモログの隣に存在することは共通であり、硬骨魚類でさらにその隣に存在する *cx39.9* のホモログが、ニワトリでも保存されていた (Fig. 6C)。ヒトは *vma21* の隣に、 *mtnr1c* ではなく GPR50 がコードされていた。 *mtnr1d* も、 *fat2* と *slc36a1* のホモログに挟まれるかたちで周囲の遺伝子の位置は保存されていた。これはスポットテッドガーやスッポン、トカゲも共通であった (Fig. 6D)。しかし、これら全骨魚や爬虫類と共通したシンテニーが保存されているにも関わらず、チキンとヒトは硬骨魚類や爬虫類のもつ *mtnr1d* と相同な配列がシンテニー領域上に存在しなかった。

以上の解析結果から、メダカの *mtnr1a* および *mtnr1b* は哺乳類の *mtnr1a* および *mtnr1b* のオーソログであり、メダカの 4 種の *mtnr* サブタイプは他の魚類および爬虫類に保存されている 4 種の *mtnr* に各々対応していることが明らかになった。

#### 4) MTNR のメラトニン応答性解析

次に、メダカ MTNR 各サブタイプがメラトニンを認識し、その情報を伝達する能力があるかどうかを調べるため、ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) 肝細胞由来の Hepa-E1 細胞をメダカ MTNR の発現ベクターを導入することで形質転換し、レポーターベクターとして cAMP 応答性ルシフェラーゼベクターを用いたレポーターアッセイを行った。その結果、4 種すべての MTNR は、メラトニンに対して濃度依存的な応答性を示した (Fig. 7)。それぞれの MTNR サブタイプの EC<sub>50</sub> 値は、1a が 0.48 nM、1b が 1.9 nM、1c が 0.062 nM、1d が 22 nM であり、メダカの 4 種の MTNR はメラトニンを受容しその

情報を伝達する能力を有することが明らかになった。

#### 5) メダカ成魚および胚における *mtnr* の発現量解析

メラトニンの曝露による変化が示された産卵のイベントは、昼夜の概日リズムに大きく影響を受けることが知られている。そこで、暗期を伝えるメラトニンを受容する MTNR の昼夜での発現量変化について調べた。14L10D のメダカ成魚の脳、眼球、鰓、心臓、腎臓、脾臓、肝臓、腸、卵巣、精巣、鱗における昼夜 (ZT7, ZT19) の *mtnr* の mRNA 発現量を定量したところ、脳、心臓、腎臓、脾臓、鱗において *mtnr1a*、*mtnr1b*、*mtnr1c*、*mtnr1d* 共に ZT7 と比べて ZT19 に発現量が増加することが示され、特に心臓では *mtnr1a*、*mtnr1b*、*mtnr1c* に、脾臓では *mtnr1a*、*mtnr1b*、*mtnr1d* に、鱗は *mtnr1a*、*mtnr1b*、*mtnr1c*、*mtnr1d* 共に、ZT7 と ZT19 の 2 点間の発現量に有意な発現量変動が認められた (Fig. 8)。一方、眼球、鰓、肝臓、腸、卵巣、精巣の ZT19 における *mtnr* の発現量は ZT7 と同じまたは ZT7 よりも低かった。測定を行ったすべての組織において、発現量は *mtnr1a* が最も多く、次いで *mtnr1b* と *mtnr1d* が同程度の発現量を示し、*mtnr1c* が最も少ない量であった。

次に、受精後 2 日目からほぼすべての個体が孵化する 12 日目までのメダカ胚について、*mtnr* の mRNA 発現量を real-time PCR で定量したところ、すべての *mtnr* サブタイプにおいて受精後 7 日目以降に発現量が上昇していたことから、胚の段階から MTNR が機能している可能性が示された (Fig. 9)。

これらの結果から、メダカ成魚では少なくとも脳、心臓、腎臓、脾臓、鱗において昼間よりも夜間に多く *mtnr* が発現していることが明らかになった。

#### 6) 脳および眼球における *mtnr* の日長特異的な発現量解析

メラトニン合成の中枢である松果腺を含む中枢神経系における各 *mtnr* の発現を調べるため、10L14D のメダカを 4 時間毎にサンプリングし、松果腺を含



む間脳、視蓋そして眼球における *mtnr* の発現量を定量した。

10L14D で飼育したメダカの間脳では *mtnr1a*, *mtnr1c*, *mtnr1d* の発現量が ZT7 に最も低く、そこから上昇し始め、ZT19 にピークをむかえることが示された (Fig. 10E, Fig. 10G, Fig. 10H)。 *mtnr1b* は、ZT7 に最も減少し、発現量が最大を示した時間帯は ZT3 だった (Fig. 10F)。間脳における *mtnr1a* の発現量は ZT19 が ZT7, 11, 23 と比べて有意に高く、*mtnr1c* と *mtnr1d* は ZT19 が ZT7 と比べて有意に高い値を示した。一方、14L10D の間脳では、*mtnr* の発現量の有意な変動は認められず、すべての *mtnr* で認められた最大の発現量を超えることはなかった (Fig. 10A, Fig. 10B, Fig. 10C, Fig. 10D)。 *mtnr* 間で視蓋における発現量を比較すると、*mtnr1a* が最も多く、次いで *mtnr1b* と *mtnr1d* が多く、*mtnr1c* は最も少なかった。

10L14D で飼育したメダカの視蓋ではすべての *mtnr* の発現量が、ZT7 に最も少なく、そこから上昇し、ZT19 に発現量のピークをむかえることが示された (Fig. 11E-H)。視蓋における *mtnr1a* の発現量は ZT19 が ZT3, 7, 23 と比べて有意に多く (Fig. 11E)、*mtnr1b* は ZT19, 23 が ZT7 と比べて有意に多い発現量を示した (Fig. 11F)。 *mtnr1d* は ZT11, 15, 19 が ZT7 と比べて有意に多い発現量を示した (Fig. 11H)。一方、14L10D の視蓋における *mtnr1a*, *mtnr1b*, *mtnr1d* の発現量は、測定した 6 時間帯の中で ZT24 に発現量が最大であった (Fig. 11A, Fig. 11B, Fig. 11D)。 *mtnr1a* と *mtnr1d* の発現量は ZT23 が ZT3, 7, 11, 19 と比べて有意に多く (Fig. 11A, Fig. 11D)、*mtnr1b* は ZT15, 19, 23 の間に有意差が認められたが、ZT15 から ZT19 に減少し、ZT23 には増加することが示された。(Fig. 11B)。 *mtnr1c* の発現量は検出限界を下回った。 *mtnr* 間で視蓋における発現量を比較すると、*mtnr1a* が最も多く、次いで *mtnr1b* と *mtnr1d* が多く、*mtnr1c* は最も少なかった。

10L14D で飼育したメダカの眼球では *mtnr1a*, *mtnr1b*, *mtnr1c* の発現量が、ZT11 に最も低く、その後上昇するが、*mtnr1a* と *mtnr1b* は ZT19 に発現量のピークをむかえ、*mtnr1c* は ZT15 に発現量のピークをむかえることが認められた (Fig. 12E-H)。 *mtnr1d* は、ZT7 に最も減少し、ピーク値を示した時間帯は ZT15 であり、ZT19 もほぼ等量の発現量を示した (Fig. 12H)。眼球における *mtnr1a* の発現量は ZT15, 19 が ZT7 と比べて有意に多く、ZT23 は ZT19 から有意に減少した (Fig. 12E)。 *mtnr1b* の発現量は ZT19 が ZT7, 11 と比べて有

意に多く (Fig. 12F)、*mtnr1d*は ZT15, 19 が ZT7, 11, 23 と比べて有意に高い値を示した (Fig. 12H)。一方、14L10D の眼球では、*mtnr1a* の発現量は ZT19 で ZT3, 7, 11, 15, 23 と比べて有意に高い値を示し (Fig. 12A)、*mtnr1b* の発現量は ZT7 で ZT11, 15 と比べて有意に高い値が認められた (Fig. 12B)。*mtnr1c* の発現量は ZT7 および ZT19 で ZT11 と比べて有意に高い値を示し (Fig. 12C)、*mtnr1d* は発現量に有意な変動は認められなかった (Fig. 12D)。*mtnr* 間で眼球における発現量を比較すると、*mtnr1a* が最も多く、次いで *mtnr1b* が多く、*mtnr1c* と *mtnr1d* は同程度で同じ光周期条件の *mtnr1a* の発現量に比べて 10 倍以上の差が示された。

以上の結果から、脳および眼球において 4 種の *mtnr* の発現量は特に 10L14D の光周期において明期に低く、暗期に上昇することが示され、特に *mtnr1a*, *mtnr1b* および *mtnr1d* ではその変動が顕著であることも明らかになった。また、今回測定を行った間脳、視蓋そして眼球では、*mtnr1a* の発現量が他の *mtnr* と比べて著しく高い値を示すことも明らかになった。

#### 7) メダカの脳と眼球における *aanat* の発現量解析

メダカにおけるメラトニンの産生に概日リズムが存在するかどうかを調べるため、メラトニン合成の律速酵素である AANAT の mRNA 発現量について real-time PCR を用いて定量した。間脳において、短日光周期のメダカの *aanat1b* の発現量は ZT7 に最も低く、ZT19 で最も高い発現量を示し、*aanat2* についても同様の傾向が認められたが、一方で長日光周期下の間脳では発現量に有意な変動は認められなかった (Fig.13B, Fig13C)。眼球では、*aanat1b* および *aanat2* の発現量が短日光周期でも長日光周期でも明期/暗期で有意な差を示した (Fig.13E, Fig13F)。眼球の *aanat1b* は両方の光周期で ZT10-15 の間に上昇し、ZT23 にピークをむかえた。一方、眼球の *aanat2* のピークは両方の光周期で ZT15 であり、暗期の終わりである ZT23 には下降した。*aanat1a* については、眼球でも間脳でも明期/暗期に有意な変化は認められなかったが、眼球における発現量は間脳の発現量の約 1,000 倍高い値を示した (Fig.13A, Fig13D)。このことから、メダカの間脳および眼球におけるメラトニン合成に

は、明期に低く暗期に高いという概日リズムが存在することが示唆された。

#### 8) ROR のメラトニン応答性解析と mRNA 発現量解析

哺乳類では MTNR の他に、核内受容体の一つである retinoic acid-related orphan receptor alpha (RORa) がメラトニンを受容することが知られている (Wiesenberg *et al.*, 1995)。そこで、この RORa のメダカオソログと、RORa のホモログであり哺乳類では既に失われている RORd1 が、メラトニンの機能的な受容体として機能しているかどうかを調べた。メダカの各 ROR のリガンド認識部位と GAL4 の DNA 結合部位をもつキメラタンパク発現ベクターを HEK293 細胞に導入し、メラトニンに対する親和性をレポーターアッセイにより調べたところ、RORa キメラタンパク発現細胞と RORd1 キメラタンパク発現細胞の両方で、10  $\mu$ M のメラトニンに対する有意な活性上昇は認められなかった (Fig. 14A, Fig. 14B)。また、メダカ成魚の各臓器における mRNA 発現量解析の結果、*rora* は脳、眼球、鰓、心臓、腎臓、脾臓、腸、卵巣で  $2 \times 10^7$  コピーを超える高い発現量を示し、一方 *rord1* は特に眼球において発現していた (Fig. 14C, Fig. 14D)。*rora* では脳を除いて、*rord1* は鱗を除いて、発現していたほとんどの組織において ZT19 と比較して ZT7 で有意な発現量の増加が認められた。さらに *rora* と *rord1* の両方が発現している眼球においてより細かく発現量を調べたが、これら発現量は昼間に高く夜間に少ない変動を示した (Fig. 14E, Fig. 14F)。以上のように、ROR はメラトニンが多いと予想される夜間よりも昼間の方が有意に発現量が増加すること、さらにメラトニンを受容して情報を伝達する能力がないことから、メダカにおいては ROR がメラトニンの受容体として機能しておらず、4 種の MTNR がメラトニンの受容体として機能している可能性が高いことが示された。

#### 9) メダカの組織における発現の局在解析

メダカにおいては MTNR がメラトニン受容体として機能していることが示

されたので、各 MTNR の機能に関する詳細な情報を得るため、免疫化学組織染色 (IHC) による MTNR の局在解析を行った。

まず 4 種のメダカ MTNR 抗体のサブタイプ特異性を確認するため、HEK293 細胞にメダカ MTNR を発現させ、これらの抗体を用いて IHC を行った。その結果、各メダカ MTNR 抗体は、対応するメダカ MTNR が発現している細胞でのみ陽性反応を示した (Fig. 15)。この結果から、各メダカ MTNR 抗体にはサブタイプ特異性があると判断し、これらを用いて以降の IHC を行った。

まず、脳における MTNR の存在を調べたところ、SCN において MTNR1a の陽性反応がみられた (Fig. 16)。次に網膜について IHC を行ったところ、視細胞で MTNR1a および MTNR1b が、内顆粒層と外顆粒層には MTNR1a が、内網状層に MTNR 1c が存在していた (Fig. 17)。鰓での IHC では、鰓弁軟骨に MTNR1b が、二次鰓弁を構成する細胞に MTNR1d が存在することが示された。また鰓の血管上に観察された血球には MTNR1a および MTNR1c が認められた (Fig. 18)。次に心臓について IHC を行ったところ、MTNR1b 抗体では心房や心室、動脈球を構成する筋細胞に陽性反応が検出された (Fig. 19, Fig. 20)。腎臓においては、MTNR1b 抗体と MTNR1d 抗体では尿細管上皮細胞に、MTNR1a 抗体では尿細管上皮細胞とは異なる尿細管構成細胞に陽性反応が検出された (Fig. 21)。一方、肝臓と脾臓での IHC では、明確な陽性反応は検出されなかった (Fig. 22, Fig. 23)。次に腸管で IHC を行ったところ、粘膜上皮細胞を構成する一部の細胞に MTNR1a が、粘膜固有層とその外側の筋肉層に MTNR1b が、粘膜上皮細胞全体に MTNR1d が存在していることが示された (Fig. 24)。精巣での IHC では、MTNR1a 抗体と MTNR1d 抗体は精細胞に、MTNR1b 抗体は精小嚢境界壁に陽性反応を検出した (Fig. 25)。次に、卵巣について IHC を行ったところ、MTNR1b 抗体では卵巣被膜の筋肉層に陽性反応が示された (Fig. 26)。また卵細胞の周辺の細胞に MTNR1a が存在していることが示された (Fig. 27)。

以上のように、メダカの 4 種のメラトニン受容体はサブタイプ特異的な存在が示されたことから、それぞれ別のメラトニンの機能を仲介していることが示された。また、脊椎動物で体内時計の中核とされる SCN に *mntnr1a* の発現が認められたことから、メラトニンが *mntnr1a* を介して概日リズムの制御に関与する可能性も示唆された。

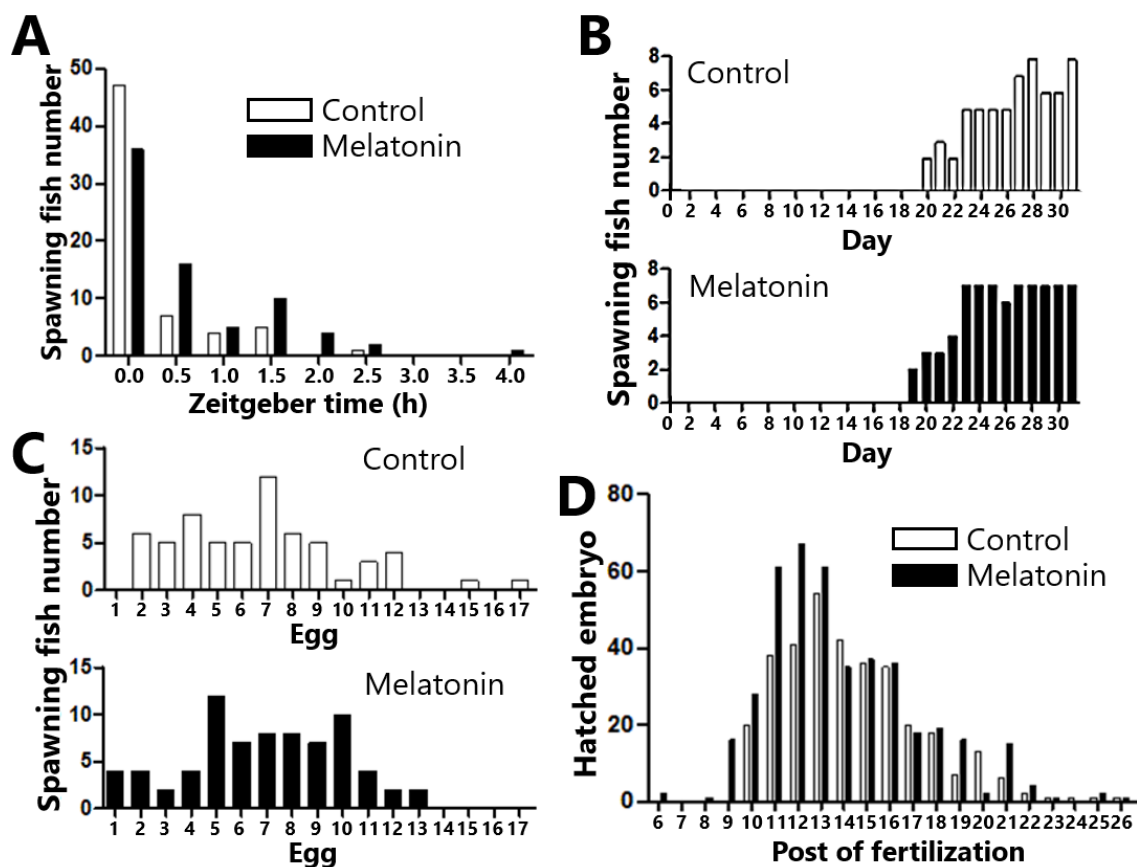


Figure 1. メラトニン曝露による産卵と胚の孵化にかかる時間の変化

雌の成魚 8 匹と雄の成魚 3 匹を 1 群とした水槽を用意し、短日光周期から長日光周期に切り替えた時点から 31 日間にわたり終濃度  $1 \mu\text{M}$  のメラトニンまたはエタノールに曝露した。棒グラフはそれぞれ、点灯後 30 分間隔で観察した時の産卵するまでにかかった時間 (A)、長日光周期への切り替えと曝露開始からの日数に対する産卵個体数 (B, 上: 対照群, 下: メラトニン曝露群)、1 回の産卵個数 (C, 上: 対照群, 下: メラトニン曝露群)、受精後から孵化に要した日数 (D) を示す。横軸は受精後から孵化までに要した日数、縦軸は孵化した胚の数を示す。白色のカラムは対照群の、黒色のカラムはメラトニン曝露群の結果を示す。

**ATGCCGGACGCAATAACCCTCATAAAGAACCGGACAGAGCCACGGCTAGGGCAGCT**  
**GGAGCGCGCCCTGGCCCCGAGGGCACCGCCCGCCCGCCTGGGTCATTGGCATCT**  
**TGGCCAGTGTTTTGATCTTCACCACGGTGGTGGACGTTCTGGGAAACCTGCTGGTC**  
**ATAATCTCTGTCTTCAGGAACCGCAAACCTGAGGAACTCTGGTAATGTGTTTGTGGT**  
**GAGCCTGGCATTGCTGACCTTGTGGTAGCCTTCTACCCTTATCCCTTGGTCCTCT**  
**ATGCTCTCTTTCATGACGGATGGGCTCTG**GGGAACACGCAGTGCATGGTCAGTGGT  
TTTCTGATGGGACTAAGTGTCATTGGTTCCATTTTCAACATCACTGGGATCGCAGT  
AAACAGATACTGCTACATCTGTCACTCGTTCTCCTACAGCCGACTGTACAGCTATC  
GCAACACTTTGCTGTTTGTGGCCTTAATTTGGGTGCTCACAGTTGTGCCATTGTT  
CCGAATTTCTTTGTTGGTTCCTTACGTTATGATCCCCGGGTCTACTCGTGCACCTT  
TGCCCAGAATGTCAGCAGTTCCTACACGGTGGCTGTAGTGGTGGTTCACCTTCTTG  
TTCCCATGCTGTGGTCACCTTTTGTACCTACGGATCTGGGTCTTGTTCATCCAG  
GTTTCGGCGTAAAGTAAAGACTGAAGAAAACCCTCGCCTCAGACCAAGTGACTTGCG  
GAATTTCATAACCATGTTTGTGTTTTTGTGCTGTTGCCATCTGCTGGGCCCCGC  
TTAACCTGATAGGCTTGGCGGTGGCAATAGATCCGACCCGTGTGGCTCCCCGCATC  
CCAGAGTGGCTTTTCGTGGTGAGCTACTTCATGGCCTACTTCAACAGCTGTCTGAA  
TGCAGTCATCTACGGTTTACTCAACAGGAATTTTAGGAATGAGTACAAACGTATTG  
TGACCTCTGTCTGGGTGACCCGGCTTTTCGTAACCTGAAACATCACGAGCTGCCACT  
GACGGCAGGAGCATGAGAAGCAAGCAGTCGTTGCCTCCACCTCTCAACAACAACGA  
GTCTGTGAGAGATCGCACAAACAAGGAATGA

Figure 2. *mtnr1b* の推定 ORF 塩基配列 (1095 bp)

赤字 : 5'-RACE により新たに得られた配列

**ATGGATTTGGAGGTGAAGGATGTGAACTGCTCCAGGAATGAGAGCGGCTGCCAGCTCA**  
**GCGATTCTTCGGCGGAGTGTCCACTGCGCTGGCCAGCGTTCTGATCTTCACCATCGT**  
**GGTCGACATCCTGGGCAACGTGCTCGTCATCATGTCAGTGTACAGGAACAAAAGCTC**  
**AGGAATGCAGGTAACATCTTCGTGGTGAGCTTGTCTGTGGCA**GACCTGGTGGTGGCAC  
TGTACCCATACCCTCTGGTCTTGACCGCAATCTTCCACAATGACTGGACAATGGGCGA  
CCTGCACTGTCAGGCCAGTGGCTTCATCATGGGCATCAGCGTCATTGGCTCCATTTTC  
AACATCACTGCCATTGCCATCAACCGCTACTGCTACATCTGCCACAGCCTGCACTACG  
ATCGGCTGTACAGCGTGAGGAACACCTGCTGTTACCTCGGCCTCACCTGGCTGCTCAC  
TGCTATCGCCACAGTGCCAAACTTCTTCGTGGGCTCGCTACAGTACGACCCTCGGATT  
TACTCCTGTACCTTTGCACAGACAGTCAGCTCATACTACACCATTTTCGGTGGTGGTGA  
TTCACTTTTTGGATCCCTCTGCTTGTGTGCTCTACTGCTACATGAGGATATGGGTGCT  
GGTGATTAAGGTGAAGCATCGGGTCAAACCTGAGCAAAGGACCAGACTGAAACCCAGC  
GATGTGAGGAACTTCCTGACTATGTTTATGGTCTTTGTCTTATTTGCTGTGTGCTGGG  
CGCCGCTGAACCTCATAGGCCTGGCCGTGGCAATAAACCTGTGAAAGTCGCCCCCAA  
TATACCGGAGTGGCTTTTTTGTCAAGCTACTTCATGGCTTACTTCAACAGCTGCCTC  
AATGCCATCATATATGGATTACTAAACCAAACCTTCCGCAAAGAATACAAAACCATCC  
TCCTTGCTCTTTGCGTGCCGCGTTTGTGATCATGGAGACCTCCAGGTGTGCCACAGA  
GGGACTAAAGAGCAAACCTTCACCTGCTGTAACAAACAACAATGTAGCAGAGATCAAT  
GTATAA

Figure 3. *mtnr1c* の推定 ORF 塩基配列 (1050 bp)

赤字 : 5'-RACE により新たに得られた配列

# A

medaka\_1a MLQNGSHLNTSS---QDPVLRPPWVTTTLGCFLIFTIVVDILGNLLVIFSVMYRNKKLR 56  
amazon\_molly\_1a MVINGSHLNSSA-QDPSDAALSRPPWVTTTLGCFLIFTIVVDILGNLLVIFSVMYRNKKLR 59  
seabass\_1a MITNGSHLNSSS-PDPADAVLNRRPPWVTTTLGCFLIFTIVVDILGNLLVIFSVMYRNKKLR 59  
goldfish\_1.7 MFMNGSSLNSSA-LDPSEQALHRPPWVTTTLGCFLIFTIVVDILGNLLVIFSVMYRNKKLR 59  
takifugu\_1.7 MVINGSDLNSSA-PDPSDAALYRPPWVTTTLGCFLIFTIVVDILGNLLVIFSVMYRNKKLR 59  
mudskipper\_1.7 MIINGSDLNSSTTPDPADTVLNRRPPWVTTTLGCFLIFTIVVDILGNLLVIFSVMYRNKKLR 60  
\* . \*\*\* \*\*.\*: . : \* \*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

medaka\_1a NAGNIFVSLAVADLVVAIYPYPLVLTSLFHNNGWNLGSVHCQISGFLMGVSVIGSIFNIT 116  
amazon\_molly\_1a NAGNIFVSLAVADLVVAIYPYPLVLTSLFHNNGWNLGNVHCQISGFLMGVSVIGSIFNIT 119  
seabass\_1a NAGNIFVSLAVADLVVAIYPYPLVLTSLFHNNGWNLGYVHCQISGFLMGVSVIGSIFNIT 119  
goldfish\_1.7 NAGNIFVSLAVADLVVAIYPYPLVLTSLFHRGWNLGYMHCQISGFLMGVSVIGSIFNIT 119  
takifugu\_1.7 NAGNIFVSLAVADLVVAIYPYPLVLTSLFHNNGWNLGSVHCQISGFLMGVSVIGSIFNIT 119  
mudskipper\_1.7 NAGNIFVSLAVADLVVAIYPDPLVLSLIFHNWNLGYMHCQISGFLMGVSVIGSIFNIT 120  
\*\*\*\*\* \*\*.\*: \*\*.\*:\*\*\*\*\*

medaka\_1a AIAINRYCYICHSLKYDKLYSDKNSVCYVILIWALTVVAIVPNLFGSLKYDPRVYSCTF 176  
amazon\_molly\_1a GIAINRYCYICHSLKYDKLYSDKNSVCYVILIWALTVVAIVPNLFGSLHYDRRVYSCTF 179  
seabass\_1a GIAINRYCYICHSLKYDKLYSDKNSVCYVMLIWALTVVAIVPNLFGSLQYDPRVYSCTF 179  
goldfish\_1.7 GIAINRYCYICHSLKYDKLYSDKNSVCYVLLIWALTVLVAIVPNLFGSLQYDPRVYSCTF 179  
takifugu\_1.7 GIAINRYCYICHSLKYDKLYSDKNSVCYVMLIWLLTVVAIVPNLFGSLQYDPRVYSCTF 179  
mudskipper\_1.7 GIAINRYCYICHSLKYDKLYSDKNSICYVILIWALTVVAIVPNLFGSLQCDPRVYSCTF 180  
. \*\*.\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\* \*\*.\*:\*\*\*\*\*: \* \*\*.\* \*\*

medaka\_1a EQSASSAYTIAVVFHFILPIMIVTYCYLRIWILVIQVRRRVKPDNRPKLTPHDVRNFVT 236  
amazon\_molly\_1a KQSASSAYTIAVVFHFILPIMIVTYCYLRIWILVIQVRRRVKPDNRPKLTPNDVRNFVT 239  
seabass\_1a EQSASSAYTIAVVFHFILPIMIVTYCYLRIWILVIQVRRRVKPDNRPKLTPHDVRNFVT 239  
goldfish\_1.7 EQSASSAYTIAVVFHFILPIMIVTYCYLRIWLVVIQVRRRVKPDNRPKLTPHDVRNFVT 239  
takifugu\_1.7 EQSASSAYTIAVVFHFILPIMIVTYCYLRIWILVIQVRRRVKPDNRPKITPHDVRNFVT 239  
mudskipper\_1.7 EQSASSAYTIAVVFHFILPIMIVTYCYLRIWLVVIQVRRRVKPDNRPKLTPHDVRNFVT 240  
:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*:\*\*\*\*\*

medaka\_1a MFVVFVLFVAVCWAPLNFIFGLAVAIKPEVVVPLIPEWLFVASYFMAYFNLSCLNAIVYGVLN 296  
amazon\_molly\_1a MFVVFVLFVAVCWAPLNFIFGLAVAIKPEVVVPLIPEWLFVASYFMAYFNLSCLNAIVYGVLN 299  
seabass\_1a MFVVFVLFVAVCWAPLNFIFGLAVAIKPEVVVPLIPEWLFVASYFMAYFNLSCLNAIVYGVLN 299  
goldfish\_1.7 MFVVFVLFVAVCWAPLNFIFGLAVAIKPEVVVPLIPEWLFVASYFMAYFNLSCLNAIVYGVLN 299  
takifugu\_1.7 MFVVFVLFVAVCWAPLNFIFGLAVAIKPEVVVPLIPEWLFVASYFMAYFNLSCLNAIVYGVLN 299  
mudskipper\_1.7 MFVVFVLFVAVCWAPLNFIFGLAVAIKPEVVVPLIPEWLFVSSYFMAYFNLSCLNAIVYGVLN 300  
\*\*\*\*\* \*\*.\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*

medaka\_1a QNFRREYKRIVVSVCTARIFFQDSSNDAGERLKSKPSPLMTNNQVKVDSV 347  
amazon\_molly\_1a QNFRREYKRIVVSVCTARIFFQDSSNDAERLKSKPSPLMTNNQVKVDSV 350  
seabass\_1a QNFRREYKRIVVSVCTARIFFQDSSNDAGERLKSKPSPLMTNNQVKVDSV 350  
goldfish\_1.7 QNFRREYKRIVVSVCTARIFFGESSNEAQLERLKSKPSPLMTNNQVKVDSV 350  
takifugu\_1.7 QNFRREYKRIVVSVCTARIFFQDSSNDAGERLKSKPSPLMTNNQVKVDSV 350  
mudskipper\_1.7 QNFRREYKRIVVSVCTARIFFQDSSNDAVERLKSKPSPLMTNNQVKVDSV 351  
\*\*\*\*\* \*\*.\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*



# B

```
medaka_1b      MPDAITLIKNRTEPRLG-QLERALAPEGTARPAWVIGILASVLIFFTVDVLDGNNLVIIIS 59
amazon_molly_1b MPDTLMLLKNRTEPRLG-QLERSLPAEGTARPAWVIAILASVLIFFTVDVLDGNNLVIIIS 59
sole_1b        MPDTLTLIQNRTEPQLEQLERTLATEGSARPAWVIAILASVLIFFTVDVLDGNNLVIIIS 60
seabass_1b     MPDTFTLIKNRTEPRLG-QLERTLATEGSARPAWVIGILASVLIFFTVDVLDGNNLVIIIS 59
takifugu_1b    MPDTFTLIKNRTELRLG-QLERAVGREGSARPAWVIGILASVLIFFTVDVLDGNNLVIIIS 59
mudskipper_1b  MPDALTLIKNRTEPGLG-QLLEHTLPTEGSARPAWVIGILASVLIFFTVDVLDGNNLVIIIS 59
***::*:*** * ***::*: **::*****.*****

medaka_1b      VFRNRKLRNSGNVVFVSLAFADLVVAFYPYPLVLYALFHDGWALGNTQCMVSGFLMGLSV 119
amazon_molly_1b VFRNRKLRNAGNVVFVSLAFADLVVAFYPYPLVLYALFHDGWALGNTQCMVSGFLMGLSV 119
sole_1b        VFRNRKLRNAGNVVFVSLAFADLVVAFYPYPLVLYALFHDGWALGNTQCTVSGFLMGLSV 120
seabass_1b     VSRNRKLRNSGNVVFVSLAFADLVVAFYPYPLVLYALFHDGWALGNTQCMVSGFLMGLSV 119
takifugu_1b    VFRNRKLRNAGNVVFVSLAFADLVVAFYPYPLVLYALFHDGWALGNTQCMVSGFLMGLSV 119
mudskipper_1b  VFRNRKLRNSGNVVFVSLAFADLVVAFYPYPLVLYALFHDGWALGNTQCMVSGFLMGLSV 119
* *****.*****

medaka_1b      IGSIFNITGIAVNRYCYICHFSYSRLYSYRNTLLFVALIWWLTVVAIVPNFFVGSRLRYD 179
amazon_molly_1b IGSIFNITGIAVNRYCYICHFSYSRLYSYRNTLLFVALIWWLTVVAIVPNFFVGSRLRYD 179
sole_1b        IGSIFNITGIAVNRYCYICHFSYSRLYSYRNTLLFVALIWWLTVVAIVPNFFVGSRLRYD 180
seabass_1b     IGSIFNITGIAVNRYCYICHFSYSRLYSYRNTLLFVALIWWLTVVAIVPNFFVGSRLRYD 179
takifugu_1b    IGSIFNITGIAVNRYCYICHFSYSRLYNYRNTLLFVALIWWLTVVAIVPNFFVGSRLRYD 179
mudskipper_1b  IGSIFNITGIAVNRYCYIRHSFSYSRLYSYRNTLLFVALIWWLTVVAIVPNFFVGSRLRYD 179
*****.*****.*****.***.***.*****.***

medaka_1b      PRVYSCTFAQNVSSSYTAVVVVHFLVPIAVVTFCYLR IWWLVIQVRRKVKTEENPRLRP 239
amazon_molly_1b PRVYSCTFAQNVSSSYTAVVVVHFLVPIAVVTFCYLR IWWLVIQVRRKVKTEDSPRLRP 239
sole_1b        PRVYSCTFAQNVSSSYTAVVVVHFLVPIAVVTFCYLR IWWLVIQVRRKVKTEECPRRLRP 240
seabass_1b     PRVYSCTFAQNVSSSYTAVVVVHFLVPIAVVTFCYLR IWWLVIQVRRKVKTEESPRRLK 239
takifugu_1b    PRVYSCTFAQNVSSSYTAVVVVHFLVPIAVVTFCYLR IWWLVIQVRRKVKTEESPRIRP 239
mudskipper_1b  PRVYSCTFAQNVSSSYTAVVVVHFLVPIGVVTFYLR IWWLVIQVRRKVKTEESPRRLP 239
*****.*****.***.*****.*****.***.***

medaka_1b      SDLRNFITMFVVFVLF AICWAPLNL IGLAVADPTRVAPRIPEWLFVVSYFMAYFNNSCLN 299
amazon_molly_1b SDLRNFITMFVVFVLF AICWAPLNL IGLAVADPTRVGPRIPEWLFVVSYFMAYFNNSCLN 299
sole_1b        SDLRNFITMFVVFVLF AICWAPLNL IGLAVADPSHVGPRIPEWLFVVSYFMAYFNNSCLN 300
seabass_1b     SDLRNFITMFVVFVLF AICWAPLNL IGLAVADPSRAAPRIPEWLFVVSYFMAYFNNSCLN 299
takifugu_1b    SDMRNFLTMFVVFVLF AICWAPLNL IGLAVADPSHVAPRIPEWLFVVSYFMAYFNNSCLN 299
mudskipper_1b  SDMRNFLTMFVVFVLF AICWAPLNL IGLAVADPLRVGPRIPEWLFVVSYFMAYFNNSCLN 299
**::***.*****.*****.***.***.*****.***.***

medaka_1b      AVIYGLLNRNFRNEYKRIVTSVWVTRLFVTETSR AATDGRSMRSKQSLPP---PLNNNES 356
amazon_molly_1b AIIYGLLNRNFRNEYKRIVTSVWVTRLFVTETSR AATDGRSMRSKQSPPP---PLNNNES 356
sole_1b        AIIYGLLNRNFRSEYKRIVTSVWVTRLFVTETSR AATDGRSMRSKQSPPPPTPPHNNNES 360
seabass_1b     AIIYGLLNRNFRNEYKRIVTSVWVTRLFVTETSR AATDGRSMRSKQSPPP---PLNNNES 356
takifugu_1b    AIIYGLLNRNFRNEYKRIVTSVWVTRLFVTETSR AATEGRSLRSKQSPPP---PLNNNES 356
mudskipper_1b  AIIYGLLNRNFRNEYKRIVTSVWVTRLFVTETSR AATDGRSMRSKQSPQP---ALNNNES 356
*::*****.*****.*****.***.***.*** * . *****

medaka_1b      VRDRTNKE----- 364
amazon_molly_1b VRDRANKE----- 364
sole_1b        LRDRVNEERNMAP----- 373
seabass_1b     VRDR----- 360
takifugu_1b    VRERTNKEQNADPCAS----- 372
mudskipper_1b  LRERTNKDCYEGWL IKMSIEKPEELDGLMDQPAYDKFVKSLED 400
*:*
```





した (Reppert and Weaver, 1995)。配列の下部のアスタリスクは、比較したすべての生物種で一致するアミノ酸を示す。

medaka (*Oryzias latipes*) 1a: XP\_004066003.1 , 1b: BAS31074.1, 1c: BAS53334.1, 1d: XP\_004073660.2、amazon molly (*Poecilia formosa*) 1a: ENSPFOT00000022043.1, 1b: ENSPFOT00000017788.2, 1c: ENSPFOT00000007217.1, 1a1: ENSPFOT00000026527.1、sole (*Solea senegalensis*) 1b: CAR82593.1, 1c: CAR82594.1, 1a1.4: CAR82592.1、sea bass (*Dicentrarchus labrax*) 1a: ACB13280.1, 1b: ACB13281.1, 1c: ACB13282.1、goldfish (*Carassius auratus*) 1a1.7: BAI65862.1, 1a1.4: BAI65861.1、takifugu (*Takifugu alboplumbeus*) 1a1.7: BAI39598.1, 1b: BAI39599.1, 1c: BAI39600.1, 1a1.4: BAI39597.1、mudsukipper (*Boleophthalmus pectinirostris*) 1a1.7: AGQ20426.1, 1b: AGQ20427.1, 1c: AGQ20428.1, 1a1.4: AGQ20425.1。

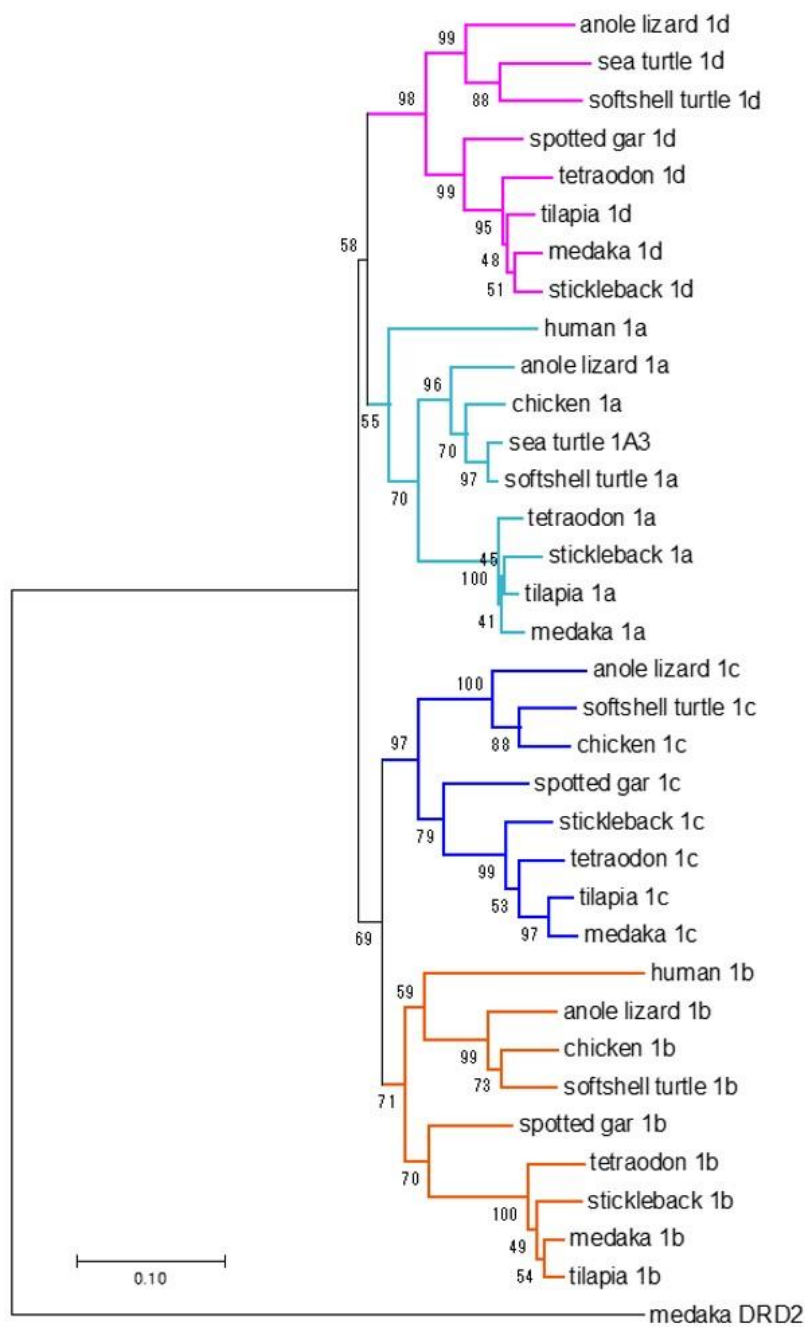
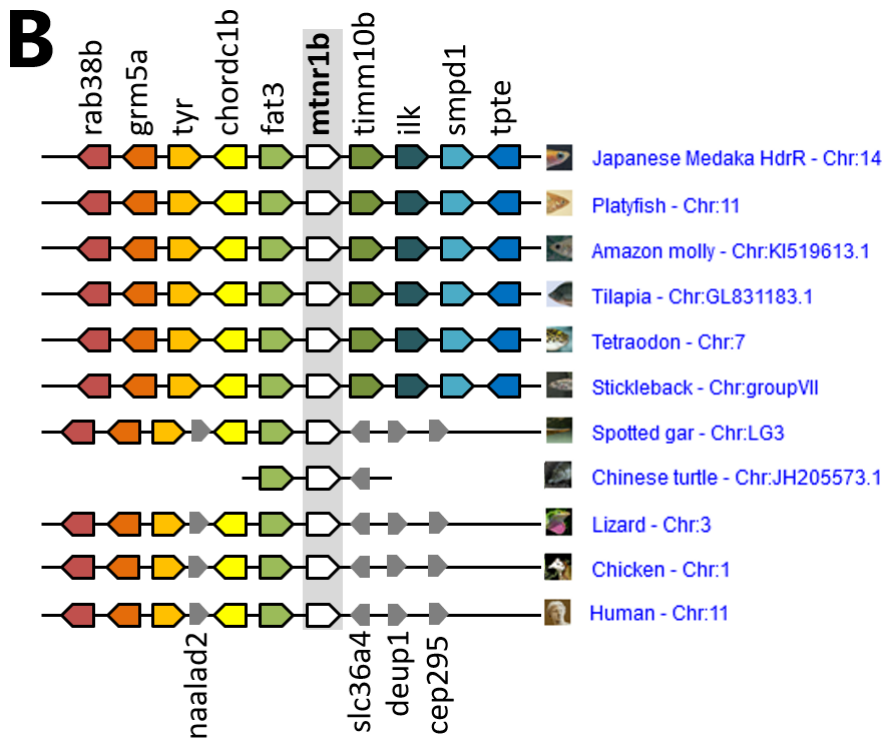
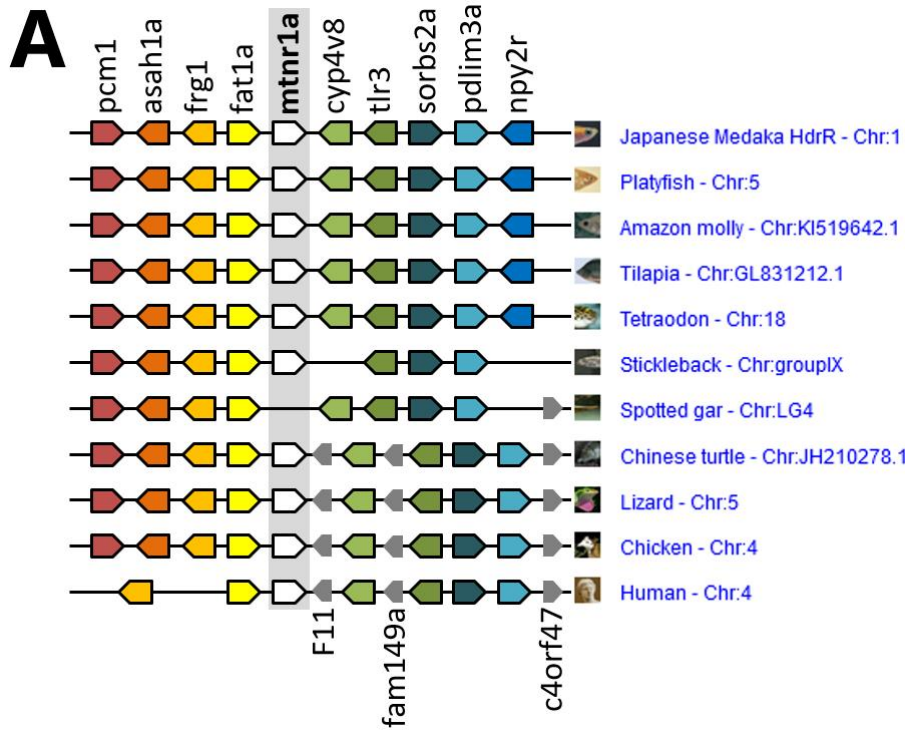


Figure 5. アミノ酸配列に基づく MTNR の系統樹解析

脊椎動物の MTNR のアミノ酸配列について系統樹解析を行った。メダカのドーパミン受容体 DRD2 をアウトグループとして使用し、Neighbor-joining 法により系統樹を作成した。各分岐点に表示されている数字は bootstrap 値を示している。硬骨魚類間の分岐を除いて、各分岐の bootstrap 値は全て 50% より高い値を示した。

Human (*Homo sapiens*) 1a: NP\_005949.1, 1b: NP\_005950.1、Chicken(*Gallus gallus*) 1a:NP\_990693.1, 1b: NP\_001280032.1, 1c: NP\_990692.1、Sea turtle (*Chelonia mydas*) 1d: EMP24711.1, 1A3: EMP33109.1、Softshell turtle (*Pelodiscus sinensis*) 1a: ENSPSIT00000001974.1, 1b: ENSPSIT00000001684.1, 1c: ENSPSIT00000000237.1, 1d: ENSPSIT000000008874.1、Anole lizard (*Anolis carolinensis*) 1a: ENSACAT00000007042.2, 1b: ENSACAT00000014670.2, 1c: NSACAT00000013281.2, 1a-like: ENSACAT00000009998.3、Spotted gar (*Lepisosteus oculatus*) 1b: ENSLOCT00000008866.1, 1c: ENSLOCT00000018184.1, 1d: ENSLOCT00000014391.1、Medaka (*Oryzias latipes*) 1a: XP\_004066003.1, 1b: BAS31074.1, 1c: BAQ59091.1, 1d: XP\_004073660.1, DRD2: XP\_004075461.1、Stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) 1a: ENSGACT00000022338.1, 1b: ENSGACT00000027283.1, 1c: ENSGACT00000024260.1, 1d: ENSGACT00000022258.1、Tilapia (*Oreochromis niloticus*) 1a: ENSONIT00000012798.1, 1b: ENSONIT00000005979.1, 1c: ENSONIT00000022473.1, 1d: ENSONIT00000005358.1、Tetraodon (*Tetraodon nigroviridis*) 1a: ENSTNIT00000010105.1, 1b: ENSTNIT00000003970.1, 1c: ENSTNIG00000008982, 1d: ENSTNIT00000003673.1。



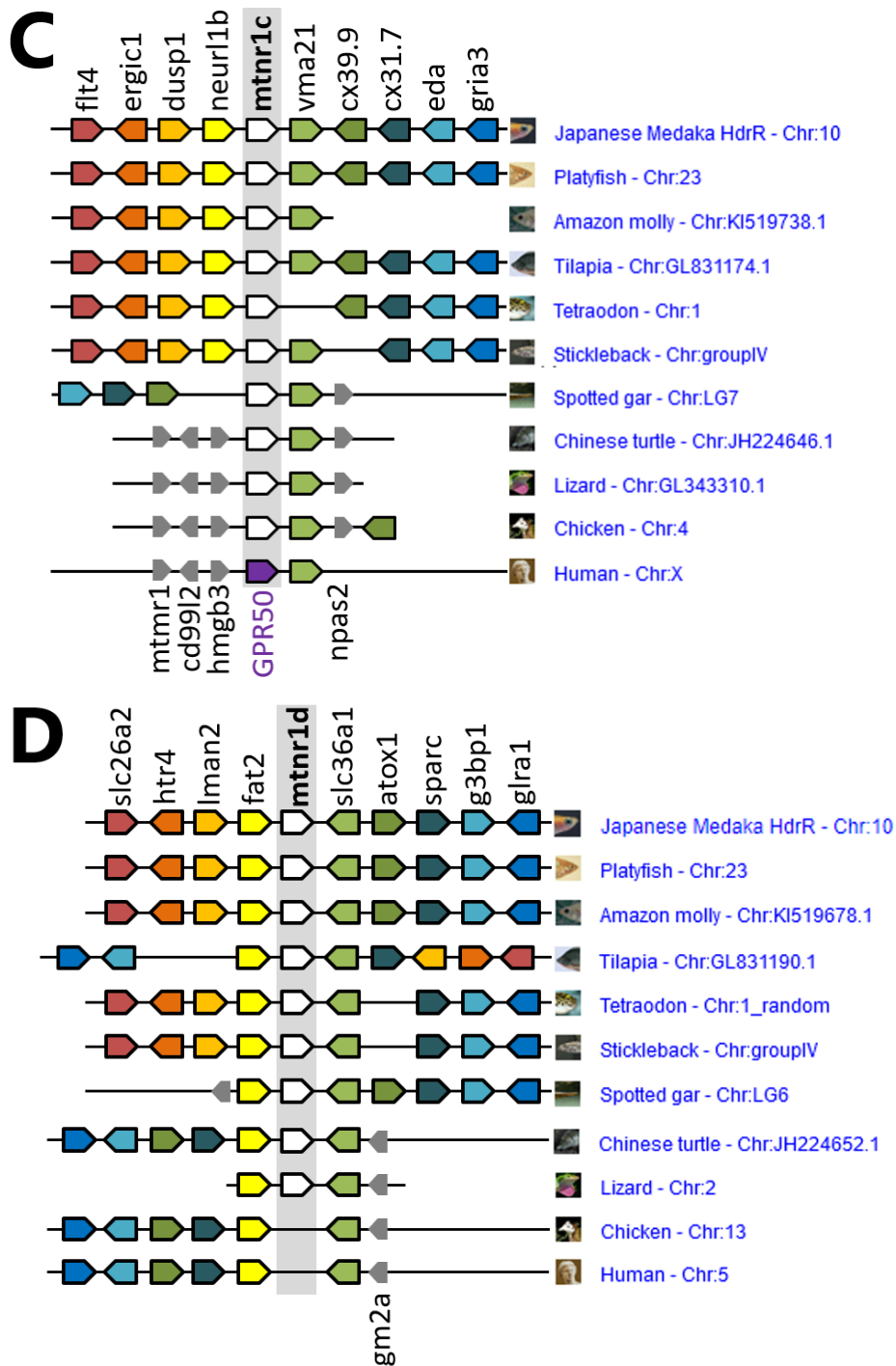


Figure 6. *mtnr* のシンテニー解析

メダカと 6 種の魚類、2 種の爬虫類、ニワトリそしてヒト間で、(A) *mtnr1a*, (B) *mtnr1b*, (C) *mtnr1c*, (D) *mtnr1d* についてシンテニー領域の比較を行った。Ensembl genome browser に登録されている他の生物種のゲノム上か



ら、メダカのゲノム上の各 *mtnr* パラログの上流と下流で見つかった遺伝子を探索した。各マスはその染色体部分に配置された遺伝子を表し、同じ色のマスはホモログであることを示している。マスの向きは遺伝子の向きを示している。灰色のマスは硬骨魚類では保存されていないが、スポッテッドガーや四足動物に保存されている遺伝子を示す。メダカの *mtnr* と同じ向きになるように全生物種の *mtnr* を表示し、それを基準として周辺の遺伝子の位置を示した。

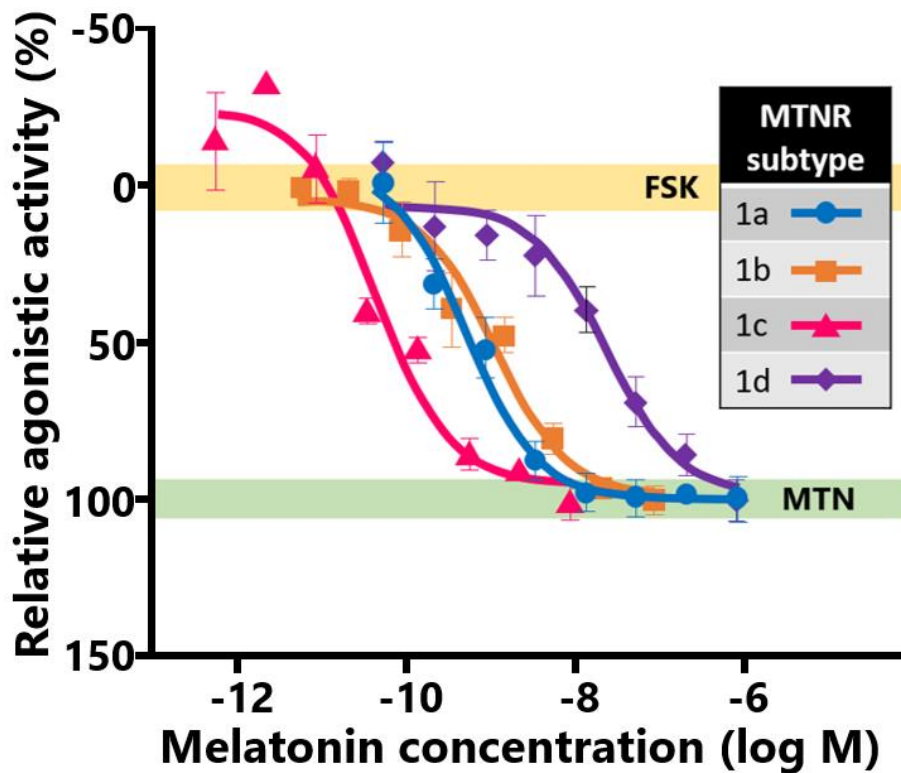


Figure 7. メダカ MTNR のメラトニン濃度応答曲線

Hepa-E1 細胞を宿主とするメダカ MTNR 発現細胞を用いて、メダカの MTNR に対するメラトニンの親和性を評価した。縦軸は終濃度 62.5  $\mu\text{M}$  の FSK のみを処理したときの発光値から、終濃度 1  $\mu\text{M}$  のメラトニンを加えたときの減少した発光値の差を 100 として、各濃度のメラトニンを処理した時の発光値の減少率を示し、横軸は細胞に処理したメラトニンの終濃度を示す。各シンボルは丸が MTNR1a、四角が MTNR1b、三角が MTNR1c、ひし形が MTNR1d の結果を示し、エラーバーは標準誤差を示す。

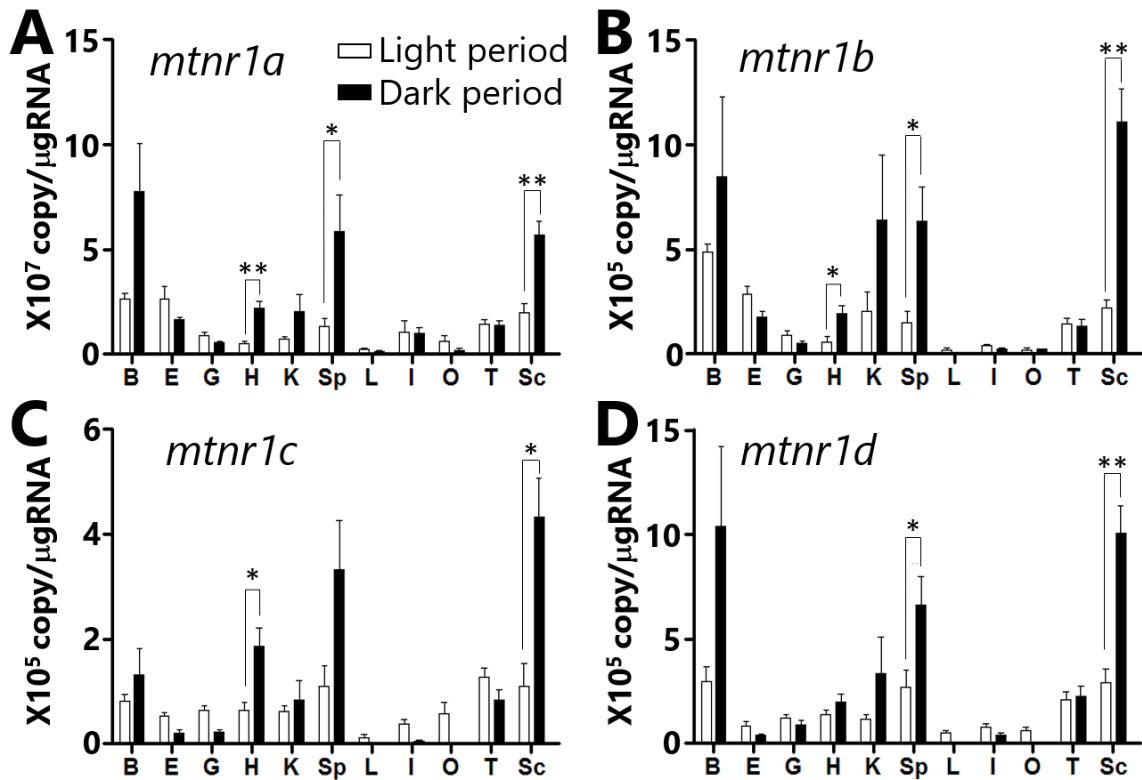


Figure 8. メダカ成魚の各組織における昼夜の *mtnr* の発現量

14L10D の光周期条件下のメダカ成魚の各組織における (A) *mtnr1a*, (B) *mtnr1b*, (C) *mtnr1c*, (D) *mtnr1d* の mRNA 発現量を real-time PCR を用いて定量した。縦軸は total RNA 1  $\mu$ g あたりの mRNA 発現量を示す。白色のグラフは ZT7 に、黒色のグラフは ZT19 にサンプリングした臓器における発現量を示す。時間帯ごとにメダカ成魚を 6 匹ずつ用いた。エラーバーは標準誤差を示し、アスタリスクは昼夜で有意差があることを示す (t-test, \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ )。

B: 脳、E: 眼球、G: 鰓、H: 心臓、K: 腎臓、Sp: 脾臓、L: 肝臓、I: 腸、O: 卵巣、T: 精巣、Sc: 鱗。

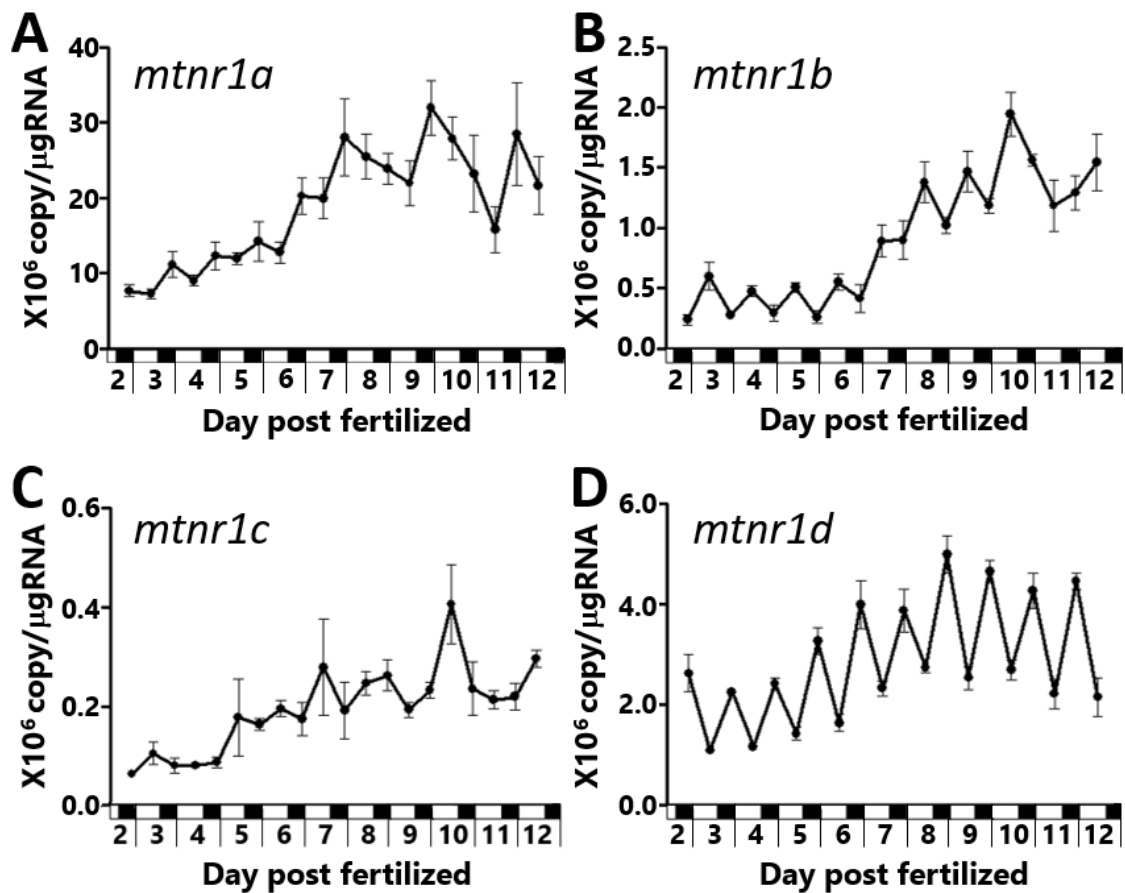


Figure 9. メダカ胚における昼夜の *mtnr* 発現量

受精後 2 日目から 12 日目のメダカ胚における (A) *mtnr1a*, (B) *mtnr1b*, (C) *mtnr1c*, (D) *mtnr1d* の mRNA 発現量を real-time PCR を用いて定量した。縦軸は total RNA 1μg あたりの mRNA 発現量を、横軸は受精後の日数を示す。横軸の白色のバーは明期を、黒色のバーは暗期を示す。20 個の胚をプールしたものを 1 群とし、サンプリング時間ごとに 3 群ずつ作製した。エラーバーは 3 群間の標準誤差を示す。

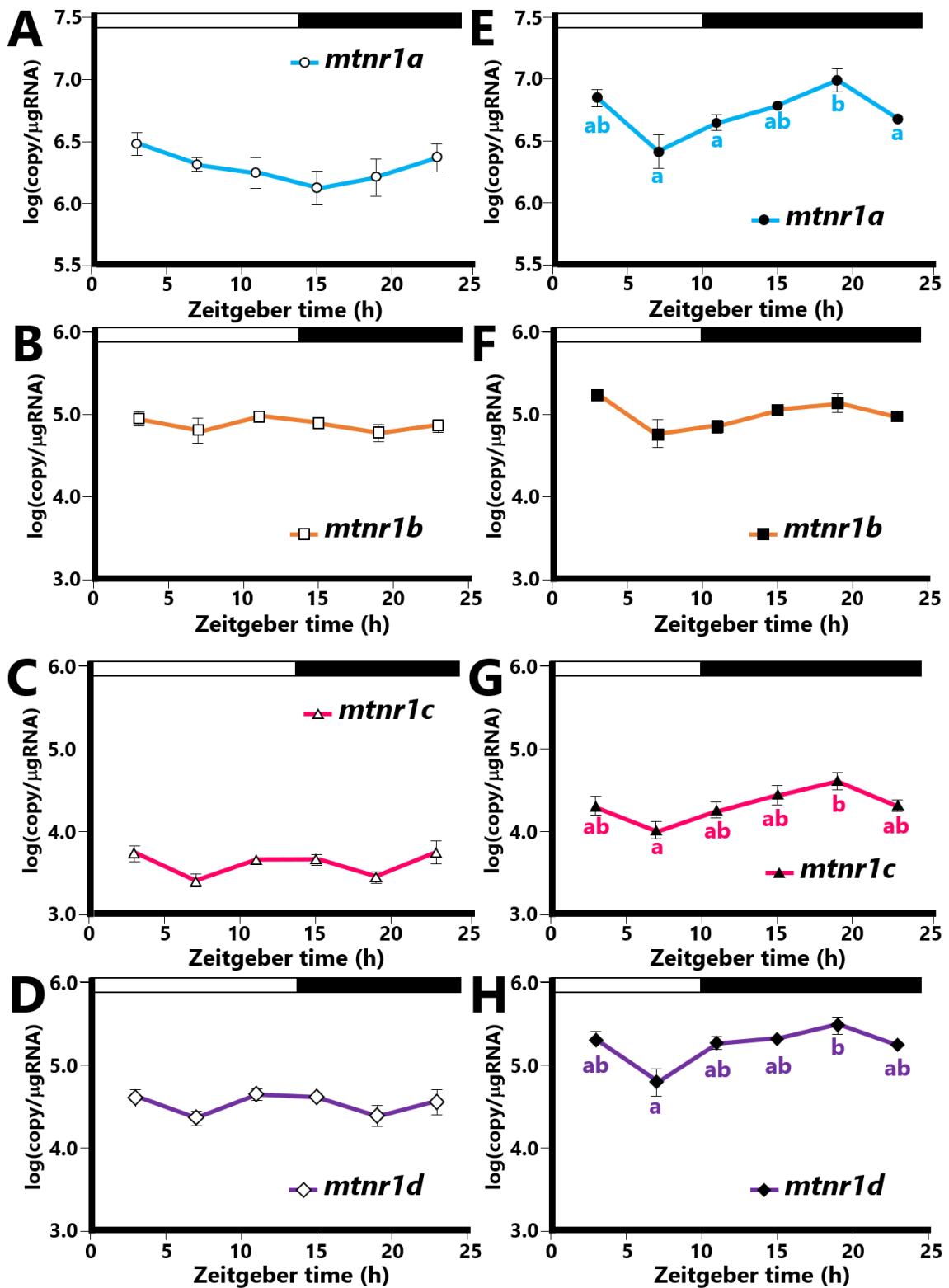


Figure 10. メダカ成魚の間脳における *mtnr* 発現量

異なる光周期条件下のメダカ成魚の間脳における *mtnr* の mRNA 発現量を real-time PCR を用いて定量した。14L10D の光周期のメダカ間脳における発現量を (A) *mtnr1a*, (B) *mtnr1b*, (C) *mtnr1c*, (D) *mtnr1d* に示し、10L14D の光周期のメダカ間脳における発現量を (E) *mtnr1a*, (F) *mtnr1b*, (G) *mtnr1c*, (H) *mtnr1d* に示す。縦軸は total RNA 1 $\mu$ g あたりの mRNA 発現量を、横軸は点灯時からの経過時間を示す。上部の白色のバーは明期を、黒色のバーは暗期を示す。時間帯ごとにメダカ成魚を 6 匹ずつ用いた。異なるアルファベットは Turkey 検定の結果、それぞれの時間帯の発現量の間には有意差が存在することを示し ( $P < 0.05$ )、エラーバーは標準誤差を示す。

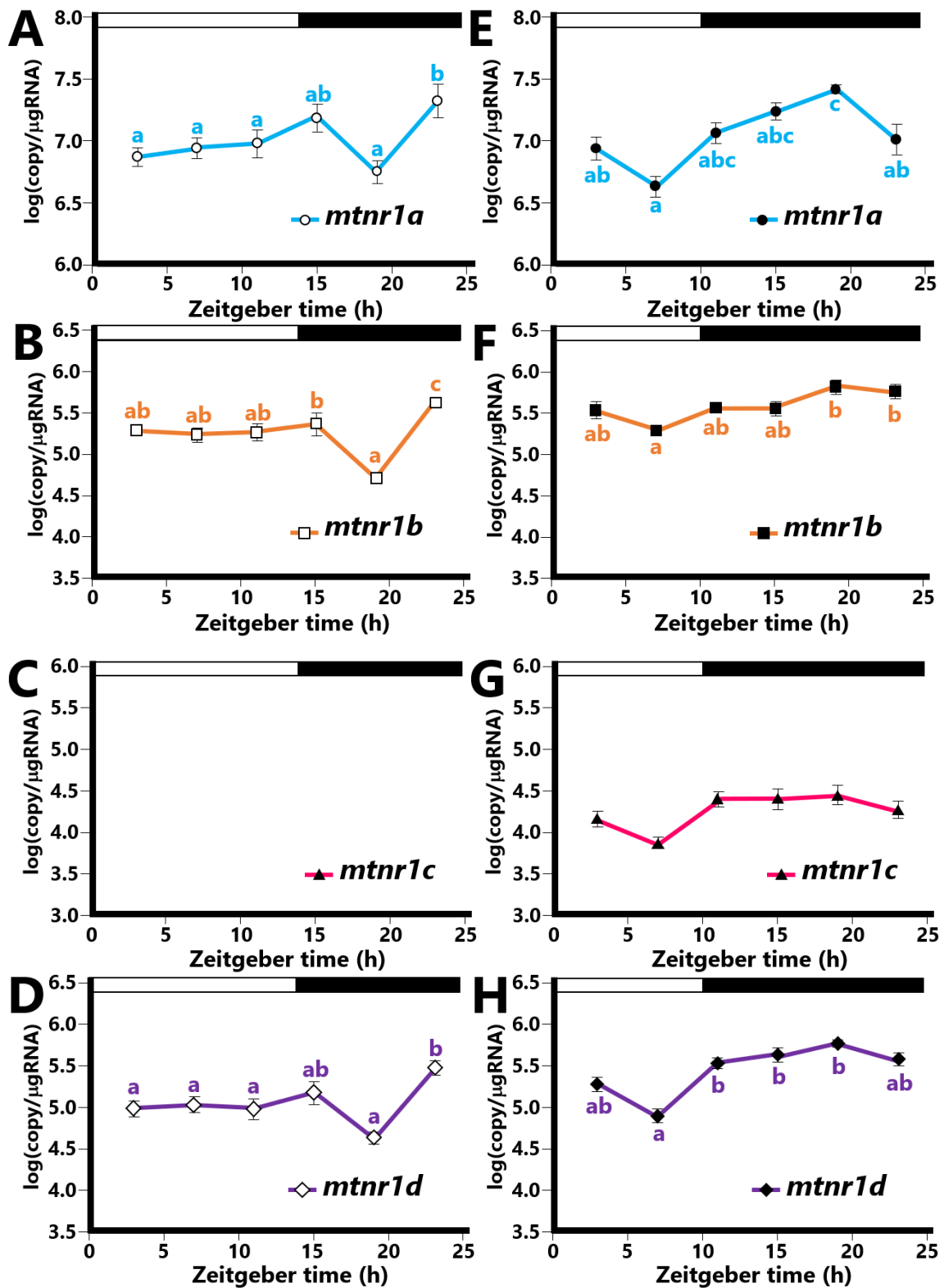


Figure 11. メダカ成魚の視蓋における *mtnr* 発現量

異なる光周期条件下のメダカ成魚の視蓋における *mtnr* の mRNA 発現量を real-time PCR を用いて定量した。14L10D の光周期のメダカ視蓋における発現量を (A) *mtnr1a*, (B) *mtnr1b*, (C) *mtnr1c*, (D) *mtnr1d* に示し、10L14D の光周期のメダカ視蓋における発現量を (E) *mtnr1a*, (F) *mtnr1b*, (G) *mtnr1c*, (H) *mtnr1d* に示す。縦軸は total RNA 1 $\mu$ g あたりの mRNA 発現量を、横軸は点灯時からの経過時間を示す。上部の白色のバーは明期を、黒色のバーは暗期を示す。時間帯ごとにメダカ成魚を 6 匹ずつ用いた。異なるアルファベットは Turkey 検定の結果、それぞれの時間帯の発現量の間には有意差が存在することを示し ( $P < 0.05$ )、エラーバーは標準誤差を示す。14L10D の視蓋における *mtnr1c* の発現量は検出限界値を下回った。



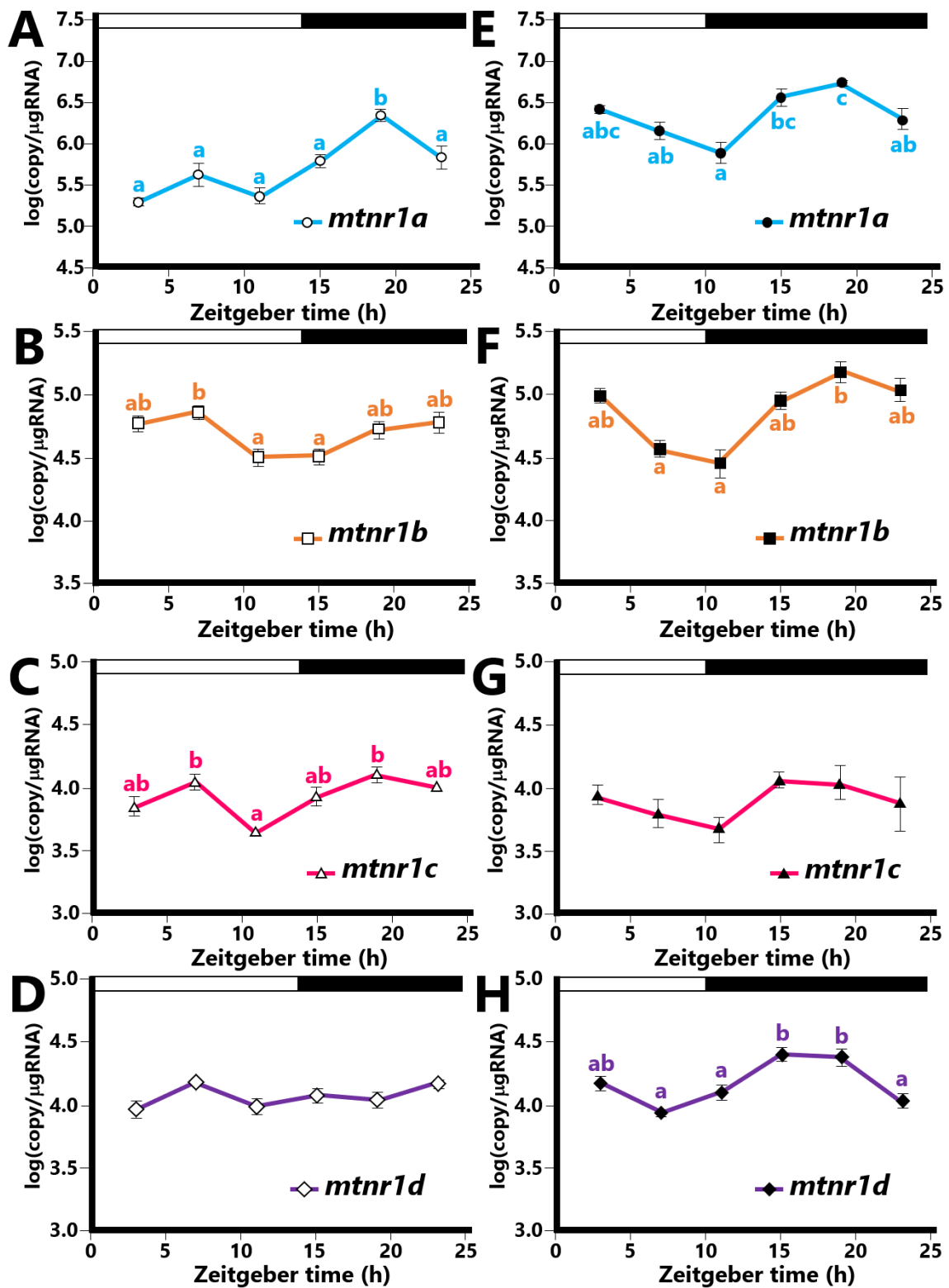


Figure 12. メダカ成魚の眼球における *mtnr* 発現量

異なる光周期条件下のメダカ成魚の眼球における *mtnr* の mRNA 発現量を real-time PCR を用いて定量した。14L10D の光周期のメダカ眼球における発現量を (A) *mtnr1a*, (B) *mtnr1b*, (C) *mtnr1c*, (D) *mtnr1d* に示し、10L14D の光周期のメダカ眼球における発現量を (E) *mtnr1a*, (F) *mtnr1b*, (G) *mtnr1c*, (H) *mtnr1d* に示す。縦軸は total RNA 1 $\mu$ g あたりの mRNA 発現量を、横軸は点灯時からの経過時間を示す。上部の白色のバーは明期を、黒色のバーは暗期を示す。時間帯ごとにメダカ成魚を 6 匹ずつ用いた。異なるアルファベットは Turkey 検定の結果、それぞれの時間帯の発現量の間には有意差が存在することを示し ( $P < 0.05$ )、エラーバーは標準誤差を示す。

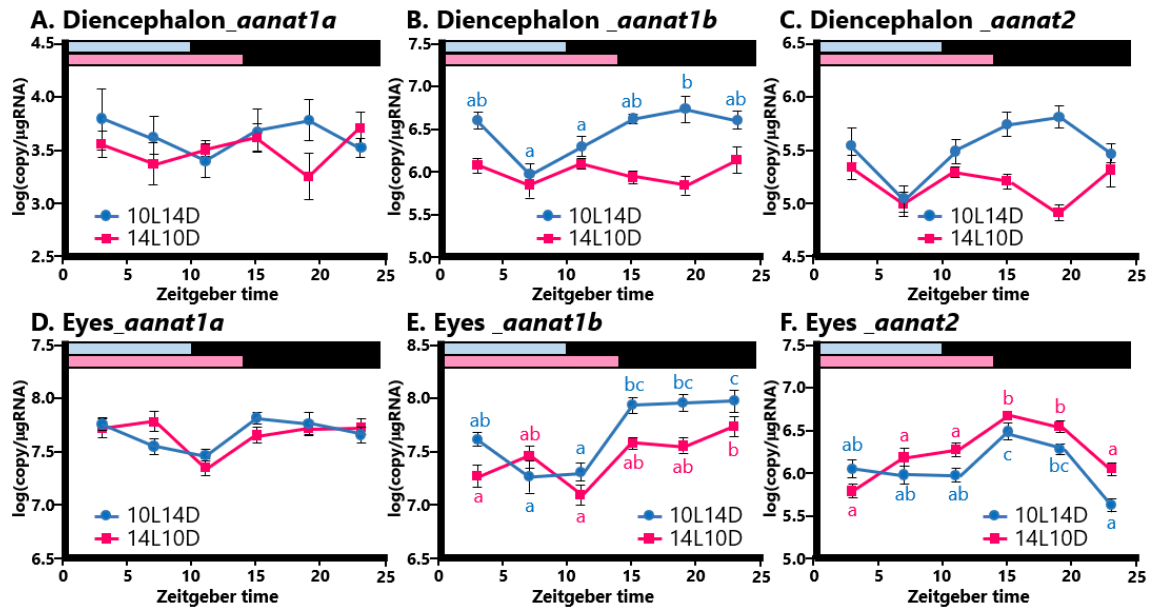


Figure 13. メダカの脳と眼球における *aanat* の発現量

ZT3, 7, 11, 15, 19, 23 の松果腺を含む間脳 (A-C) と眼球 (D-F) におけるメラトニン前駆体合成酵素 *aanat1a*, *aanat1b*, *aanat2* の mRNA 発現量を real-time PCR を用いて定量した。縦軸は total RNA 1μg あたりの mRNA 発現量を、横軸は点灯時からの経過時間を示す。上部の水色のバーは短日光周期の明期を、桃色のバーは長日光周期の明期を示し、黒いバーはそれぞれの光周期の暗期を示す。異なるアルファベットは、Turkey 検定の結果それぞれの時間帯の発現量の間には有意差が存在することを示す ( $P < 0.05$ )。エラーバーは標準誤差を示す ( $n=6$ )。

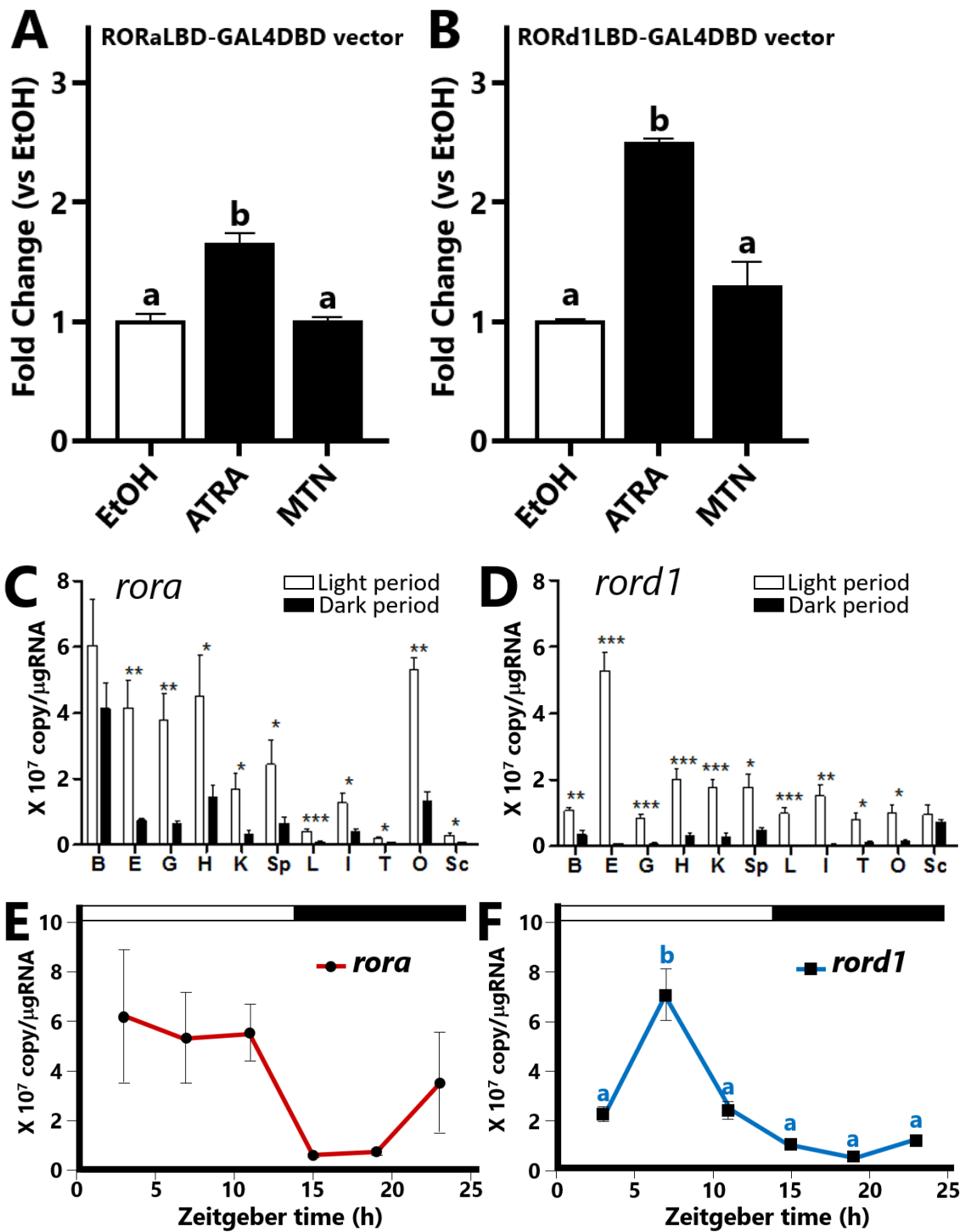


Figure 14. メダカ ROR のリガンド結合領域のメラトニン応答性の確認とメダカ成魚の各組織における *ror* の発現量

ヒトではメラトニンをリガンドとすることが報告されている RORa (A) と、魚類特有の RORd1 (B) について、メダカ RORLBD-GAL4DBD キメラタンパク発現ベクターを作製し、HEK293 細胞を宿主とする発現細胞を用いてメダカの ROR がメラトニンをリガンドとするかを調べた。各サンプルの発光量を対照群であるエタノール添加細胞の発光量で割った相対比を、Fold Change として評価に用いた。異なるアルファベットは t-test の結果、対照群の発光量と有意差が存在することを示し ( $P < 0.05$ )、エラーバーは標準誤差を示す。EtOH : エタノール、ATRA : all-trans retinoic acid、MTN : メラトニン。

また、14L10D の光周期条件下のメダカ成魚の各組織における *rora* (C) と *rord1* (D) の mRNA 発現量を real-time PCR を用いて定量した。縦軸は total RNA 1  $\mu$ g あたりの mRNA 発現量を示す。白色のグラフは ZT7 に、黒色のグラフは ZT19 にサンプリングした臓器における発現量を示す。時間帯ごとにメダカ成魚を 6 匹ずつ用いた。エラーバーは標準誤差を示し、アスタリスクは昼夜で有意差があることを示す (t-test, \*:  $P < 0.05$ , \*\*:  $P < 0.01$ , \*\*\*:  $P < 0.001$ )。B : 脳、E : 眼球、G : 鰓、H : 心臓、K : 腎臓、Sp : 脾臓、L : 肝臓、I : 腸、O : 卵巣、T : 精巣、Sc : 鱗。

さらに、14L10D の光周期条件下のメダカについて、ZT3, 7, 11, 15, 19, 23 の眼球における *rora* (E) と *rord1* (F) の mRNA 発現量を real-time PCR を用いて定量した。縦軸は total RNA 1  $\mu$ g あたりの mRNA 発現量を、横軸は点灯時からの経過時間を示す。上部の白色のバーは明期を、黒色のバーは暗期を示す。時間帯ごとにメダカ成魚を 6 匹ずつ用いた。異なるアルファベットは Turkey 検定の結果、それぞれの時間帯の発現量の間有意差が存在することを示し ( $P < 0.05$ )、エラーバーは標準誤差を示す。

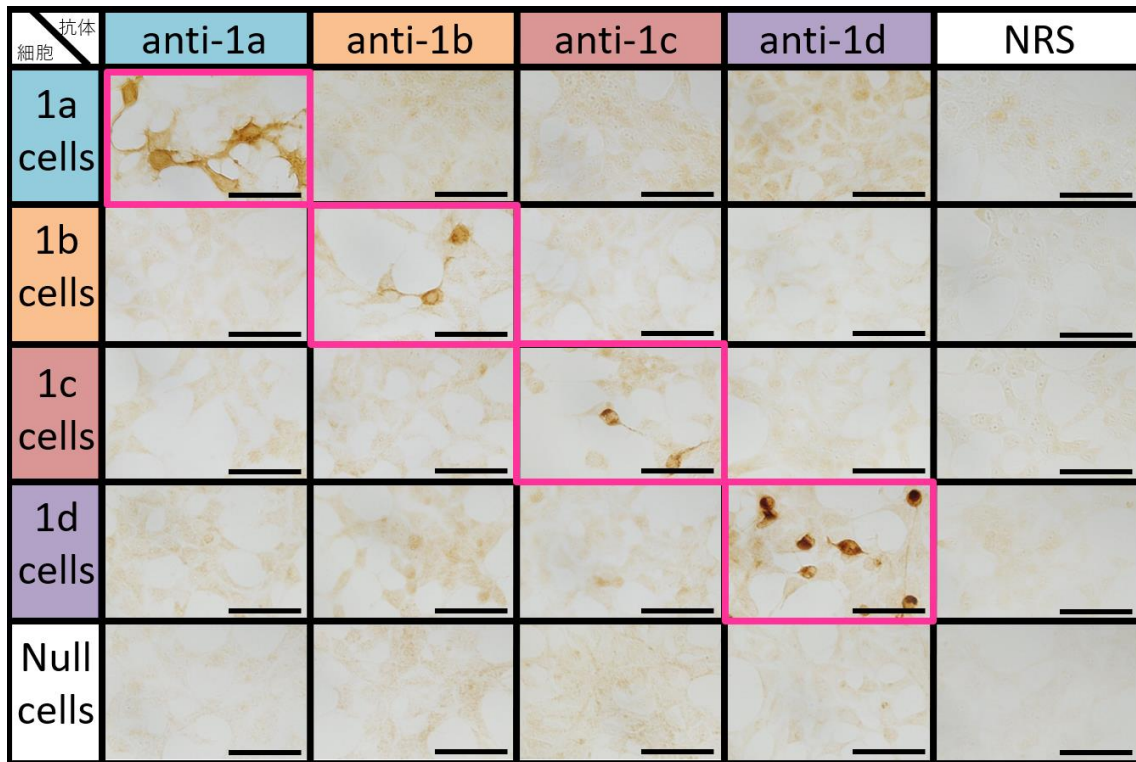


Figure 15. 4 種のメダカ MTNR 抗体のサブタイプ特異性の確認

一過的にメダカ MTNR を発現させた Hepa-E1 細胞について、4 種のメダカ MTNR 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。行ごとに異なる発現細胞で、列ごとに異なる抗体を用いた結果を示している。Null cells は何もクローニングしていない pcDNA3.1 vector を導入した細胞である。NRS (normal rabbit serum) の列の細胞には、抗原を打つ前のウサギの血清を処理した。各メダカ MTNR 抗体は、対応するメダカ MTNR が発現している細胞でのみ陽性反応を示した。スケールバー : 50  $\mu$ m

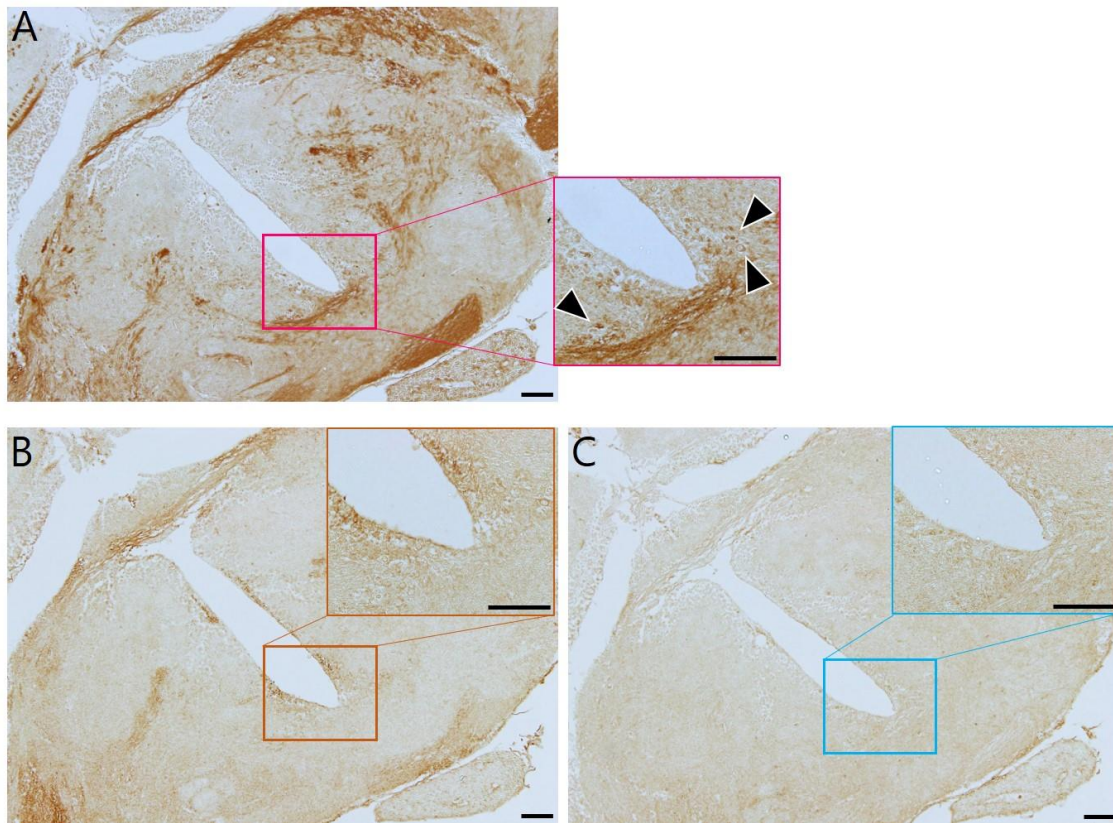


Figure 16. メダカ成魚の脳における MTNR の発現局在

10L14D の光周期条件の ZT19 のメダカ成魚の脳切片について、メダカ MTNR 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。(A)は MTNR1a 抗体、(B)は MTNR1b 抗体、(C)は MTNR1c 抗体を一次抗体として用いた結果を示している。図中の矢頭は MTNR1a 抗体で陽性反応が検出された場所を示す。スケールバー：50  $\mu\text{m}$



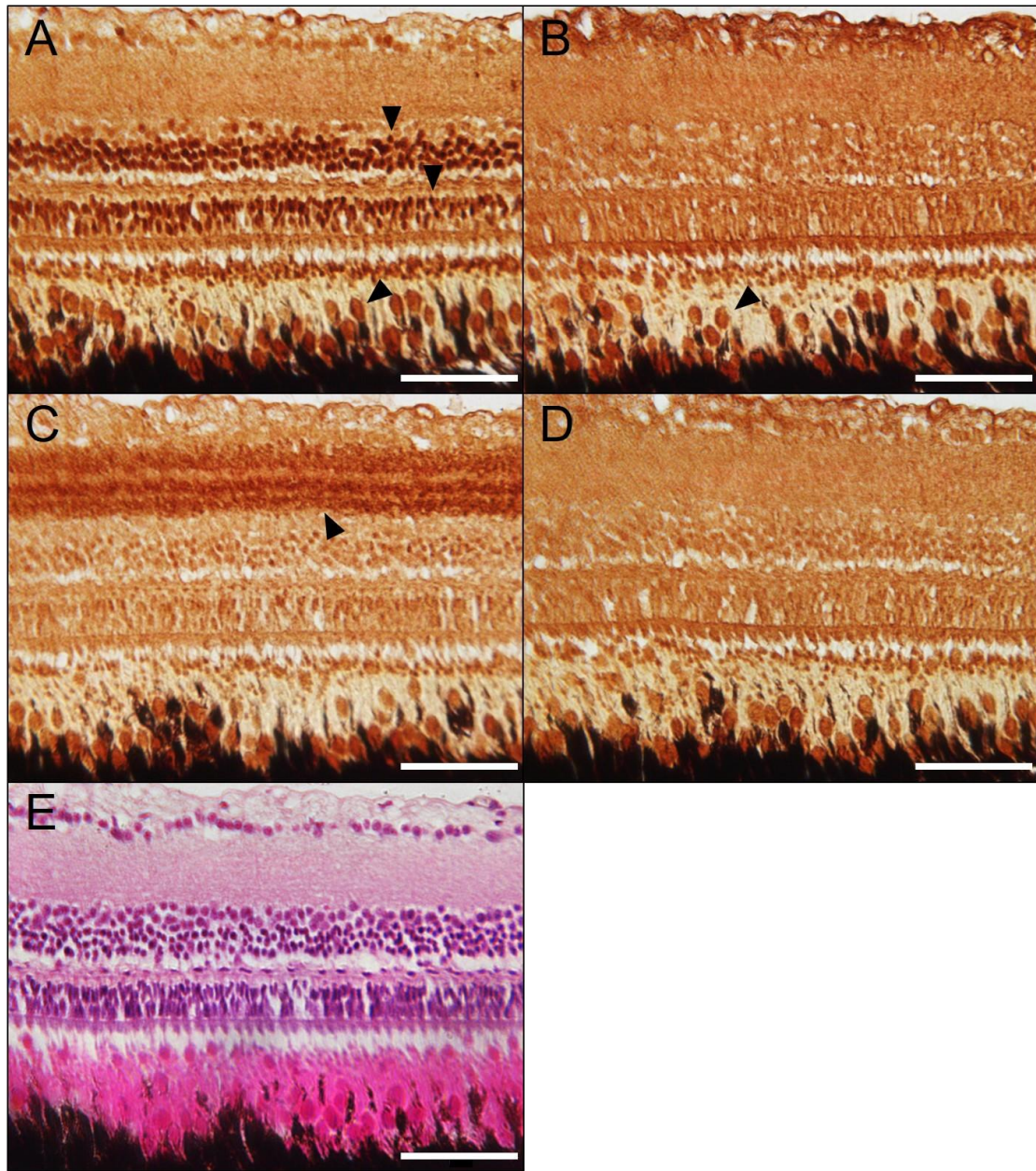


Figure 17. メダカ成魚の網膜における MTNR の発現局在

10L14D の光周期条件の ZT19 のメダカ成魚の網膜切片について、メダカ MTNR 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。(A) は MTNR1a 抗体、(B) は MTNR1b 抗体、(C) は MTNR1c 抗体、(D) は MTNR1d 抗体を一次抗体として用いた結果を示し、(E) は HE 染色像を示している。図中の矢頭は各抗体で陽性反応が検出された場所を示す。スケールバー：50 μm



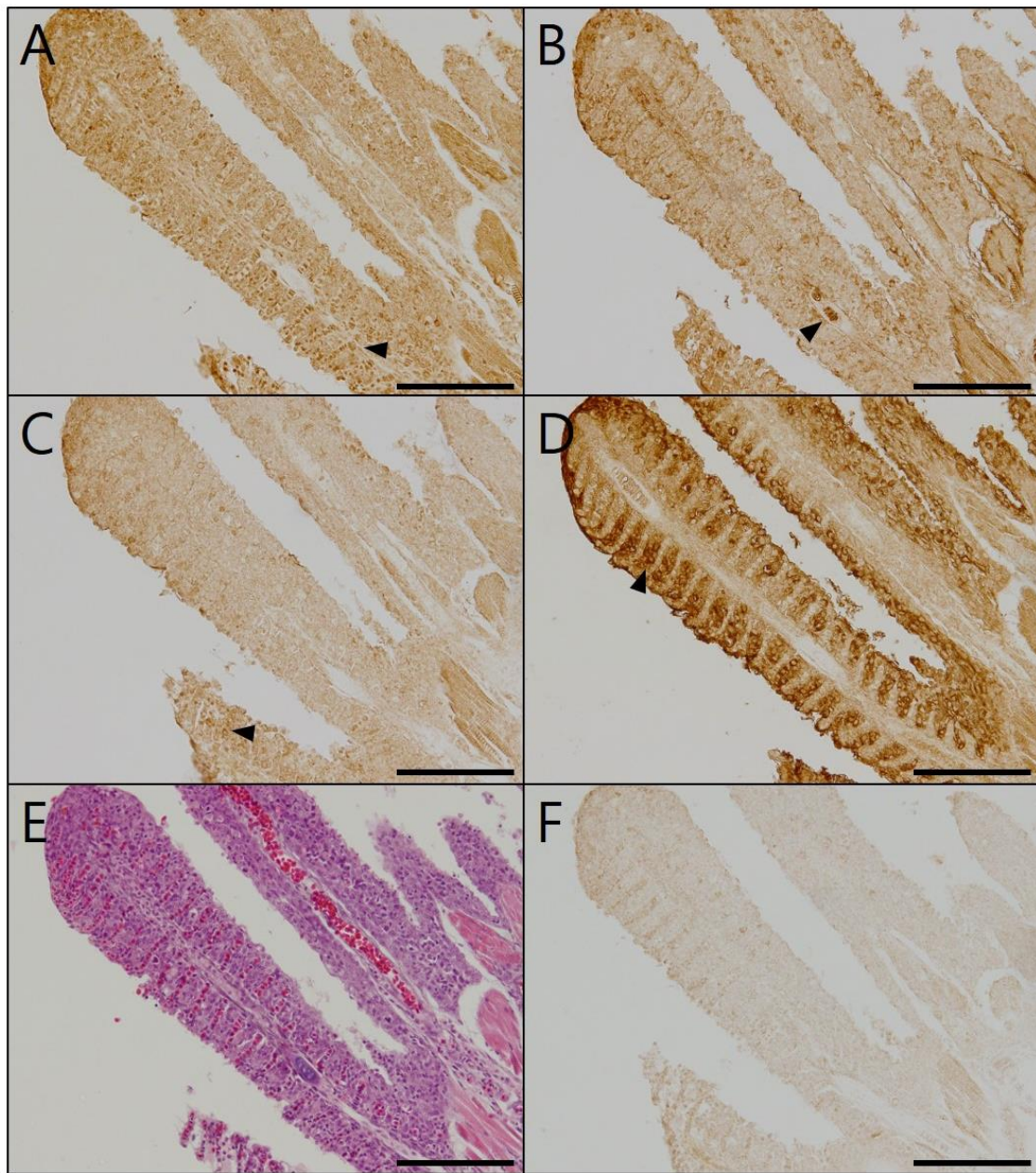


Figure 18. メダカ成魚の鰓における MTNR の発現局在

10L14D の光周期条件の ZT19 のメダカ成魚の鰓切片について、メダカ MTNR 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。(A)はMTNR1a 抗体、(B)はMTNR1b 抗体、(C)はMTNR1c 抗体、(D)はMTNR1d 抗体、(F)はNRS を一次抗体として用いた結果を示し、(E)はHE 染色像を示している。図中の矢頭は各抗体で陽性反応が検出された場所を示す。スケールバー：100  $\mu\text{m}$



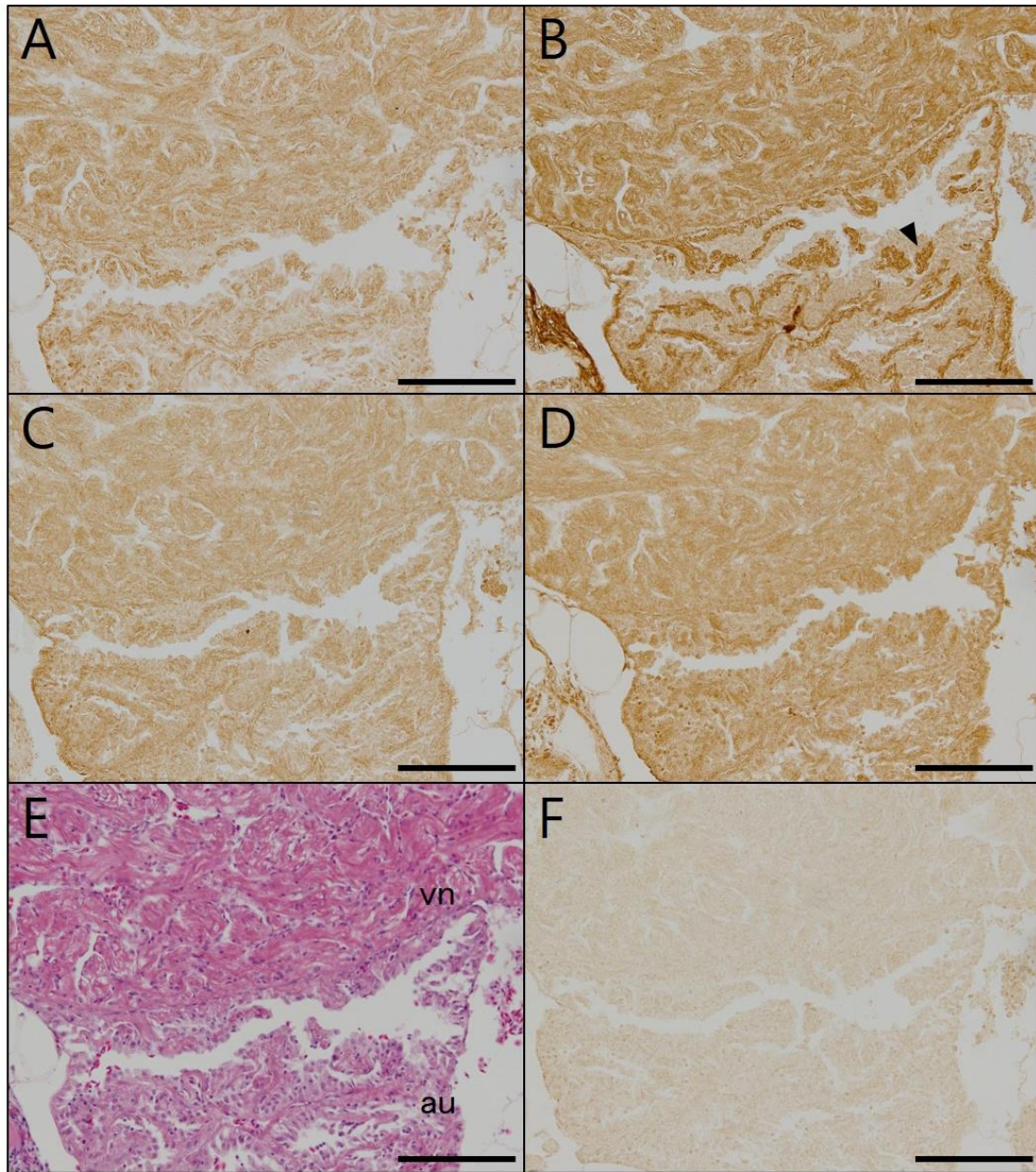


Figure 19. メダカ成魚の心房と心室における MTNR の発現局在

10L14D の光周期条件の ZT19 のメダカ成魚の心臓切片について、メダカ MTNR 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。(A) は MTNR1a 抗体、(B) は MTNR1b 抗体、(C) は MTNR1c 抗体、(D) は MTNR1d 抗体、(F) は NRS を一次抗体として用いた結果を示し、(E) は HE 染色像を示している。図中の矢頭は各抗体で陽性反応が検出された場所を示す。au: atrium (心房)、vn: ventricle (心室)。スケールバー : 100  $\mu$ m



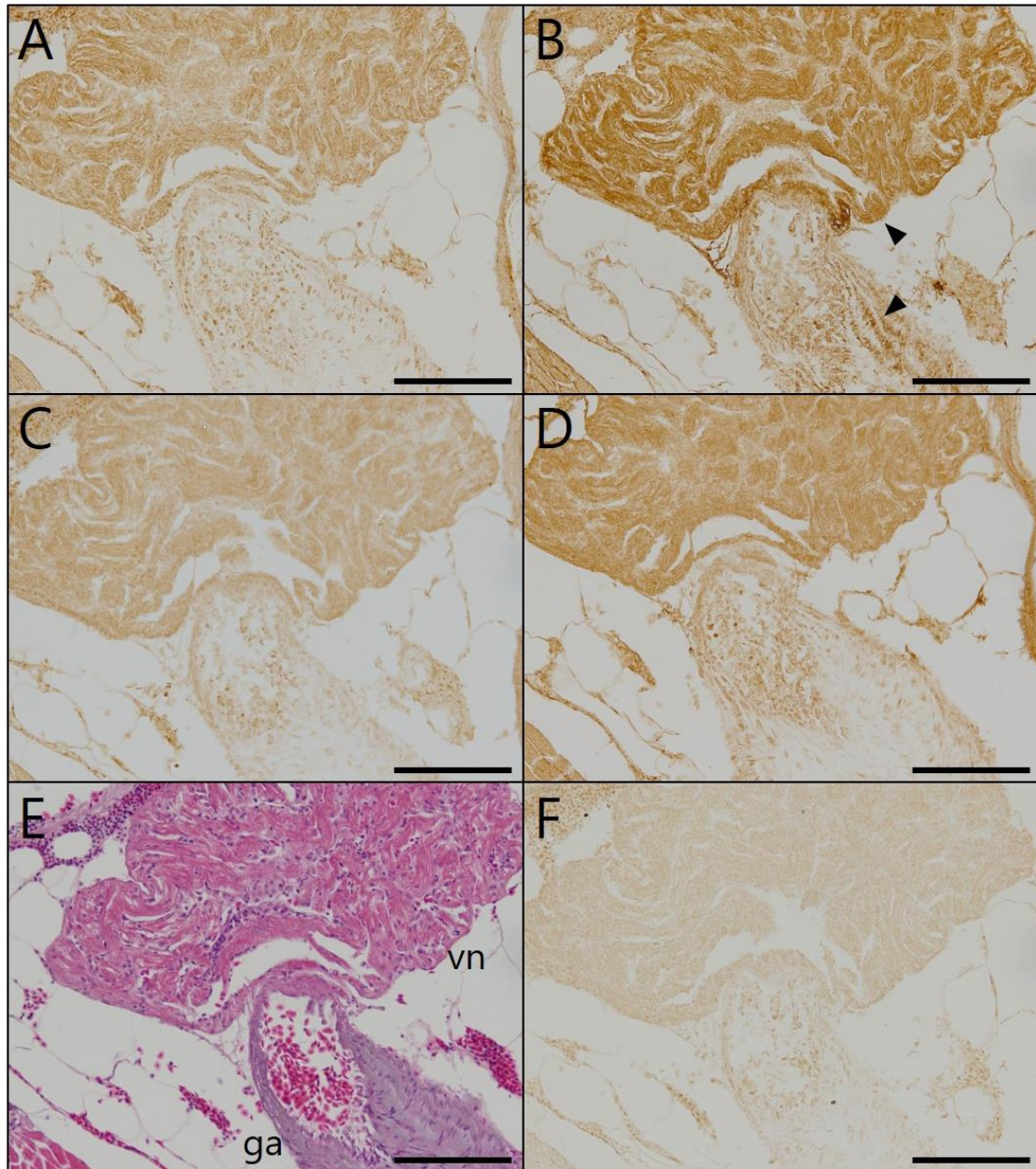


Figure 20. メダカ成魚の心室と動脈球における MTNR の発現局在

10L14D の光周期条件の ZT19 のメダカ成魚の心臓切片について、メダカ MTNR 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。(A) は MTNR1a 抗体、(B) は MTNR1b 抗体、(C) は MTNR1c 抗体、(D) は MTNR1d 抗体、(F) は NRS を一次抗体として用いた結果を示し、(E) は HE 染色像を示している。図中の矢頭は各抗体で陽性反応が検出された場所を示す。vn: ventricle (心室)、ga: bulbus arteriosus (動脈球)。スケールバー : 100  $\mu$ m



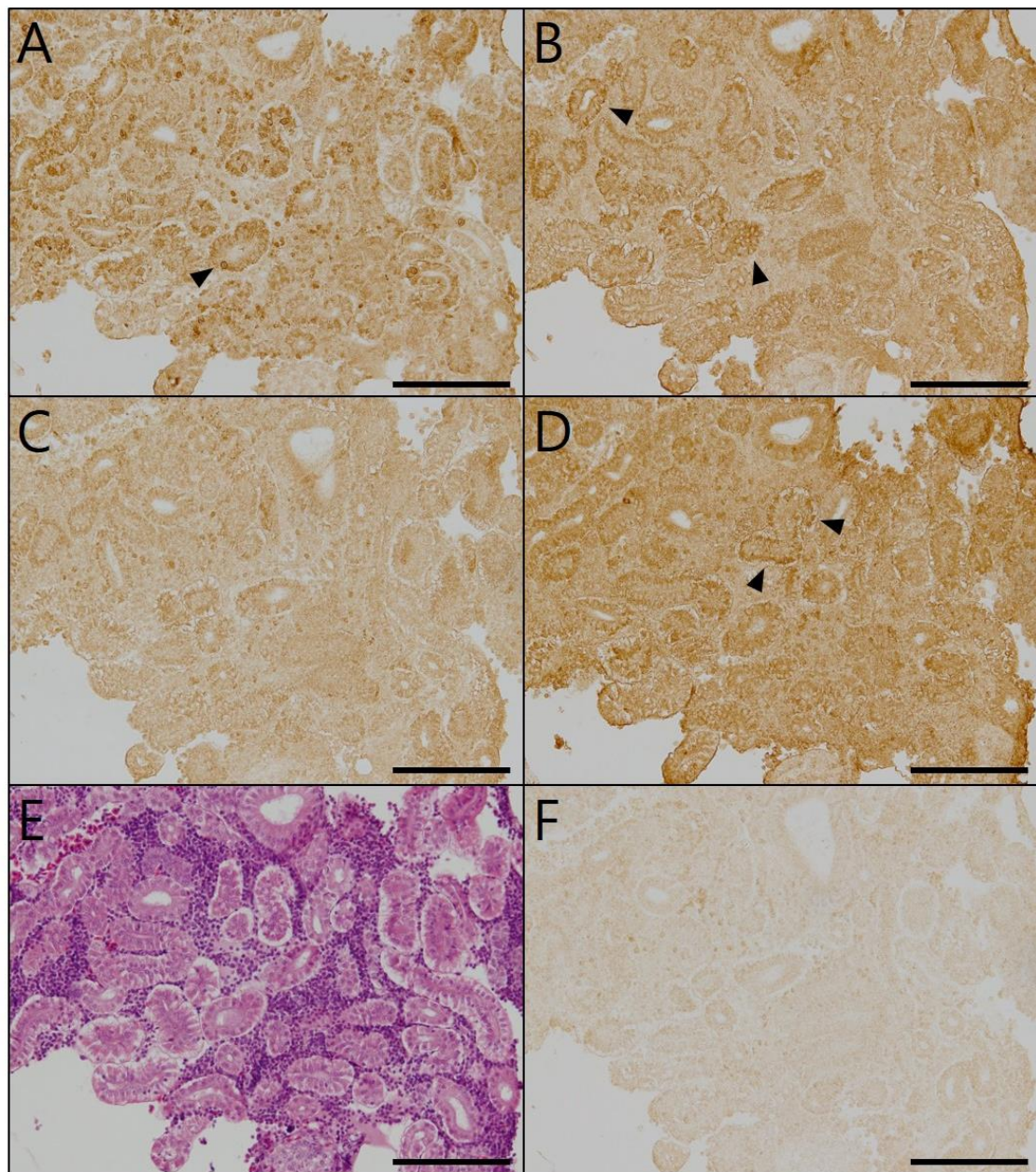


Figure 21. メダカ成魚の腎臓における MTNR の発現局在

10L14D の光周期条件の ZT19 のメダカ成魚の腎臓切片について、メダカ MTNR 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。(A) は MTNR1a 抗体、(B) は MTNR1b 抗体、(C) は MTNR1c 抗体、(D) は MTNR1d 抗体、(F) は NRS を一次抗体として用いた結果を示し、(E) は HE 染色像を示している。図中の矢頭は各抗体で陽性反応が検出された場所を示す。スケールバー：100  $\mu\text{m}$



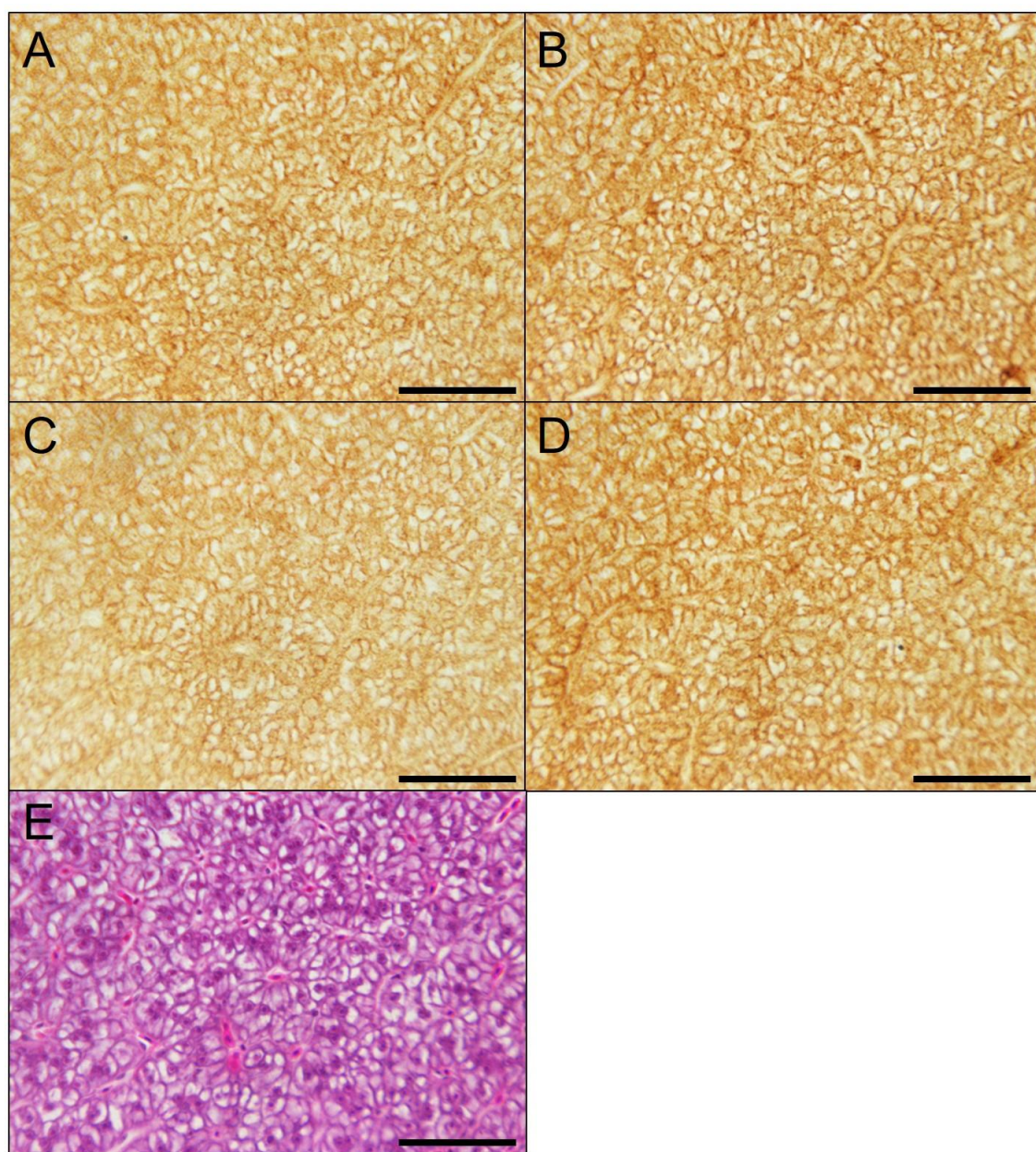


Figure 22. メダカ成魚の肝臓における MTNR の発現局在

10L14D の光周期条件の ZT19 のメダカ成魚の肝臓切片について、メダカ MTNR 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。(A) は MTNR1a 抗体、(B) は MTNR1b 抗体、(C) は MTNR1c 抗体、(D) は MTNR1d 抗体を一次抗体として用いた結果を示し、(E) は HE 染色像を示している。スケールバー : 50  $\mu$ m



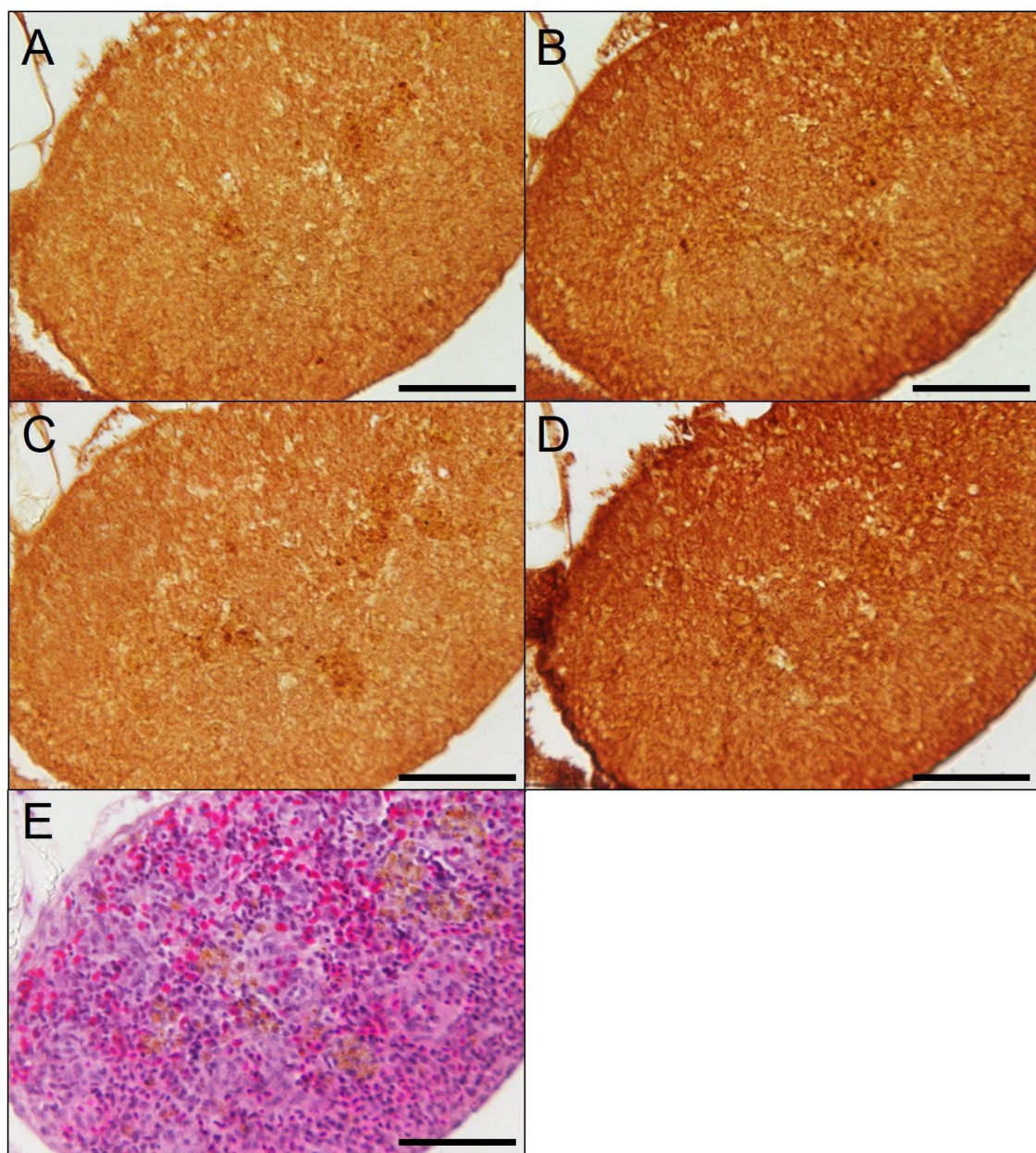


Figure 23. メダカ成魚の脾臓における MTNR の発現局在

10L14D の光周期条件の ZT19 のメダカ成魚の脾臓切片について、メダカ MTNR 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。(A) は MTNR1a 抗体、(B) は MTNR1b 抗体、(C) は MTNR1c 抗体、(D) は MTNR1d 抗体を一次抗体として用いた結果を示し、(E) は HE 染色像を示している。スケールバー : 50  $\mu$ m



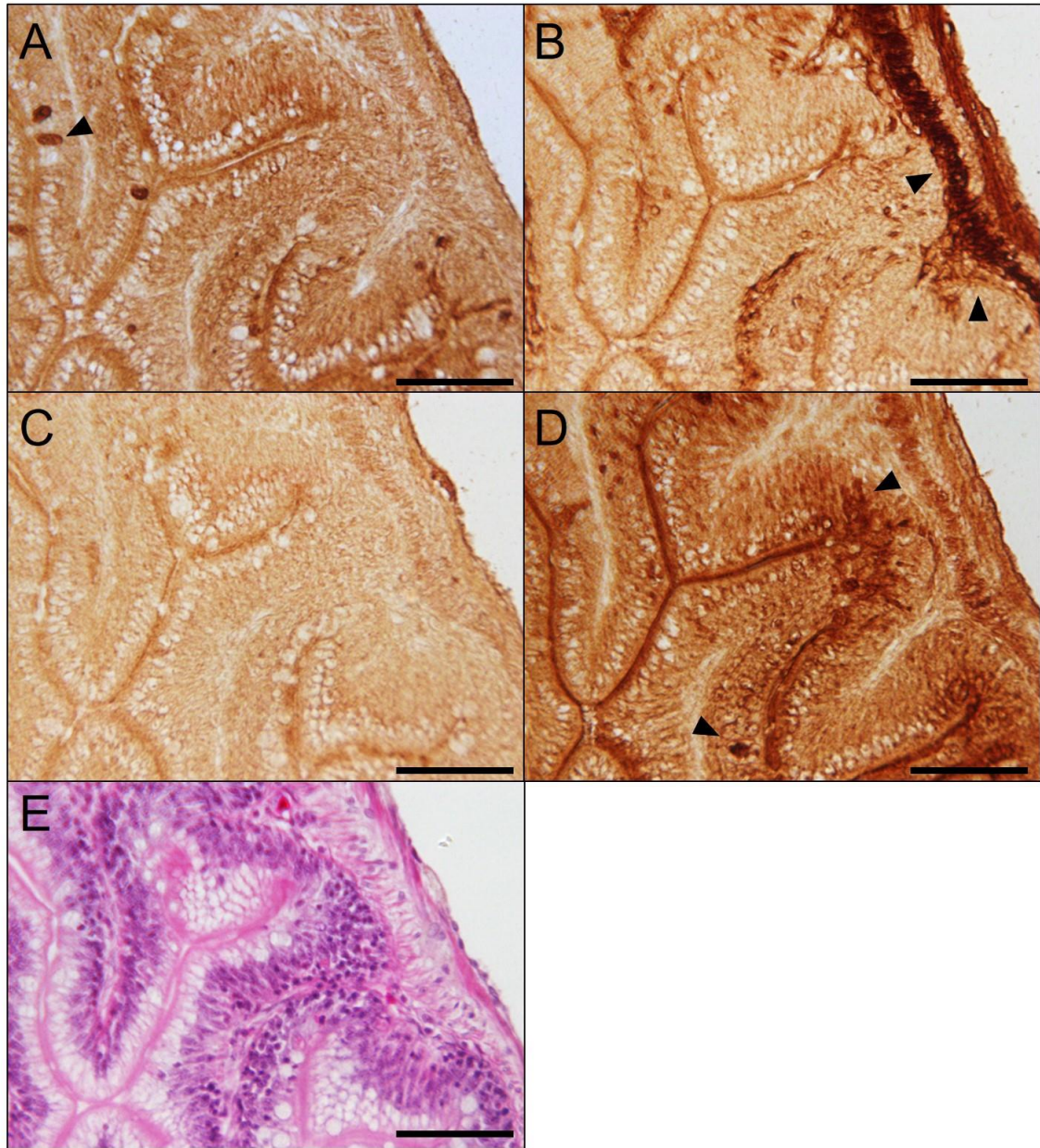


Figure 24. メダカ成魚の腸における MTNR の発現局在

10L14D の光周期条件の ZT19 のメダカ成魚の腸切片について、メダカ MTNR 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。(A)は MTNR1a 抗体、(B)は MTNR1b 抗体、(C)は MTNR1c 抗体、(D)は MTNR1d 抗体を一次抗体として用いた結果を示し、(E)は HE 染色像を示している。図中の矢頭は各抗体で陽性反応が検出された場所を示す。スケールバー：50  $\mu\text{m}$



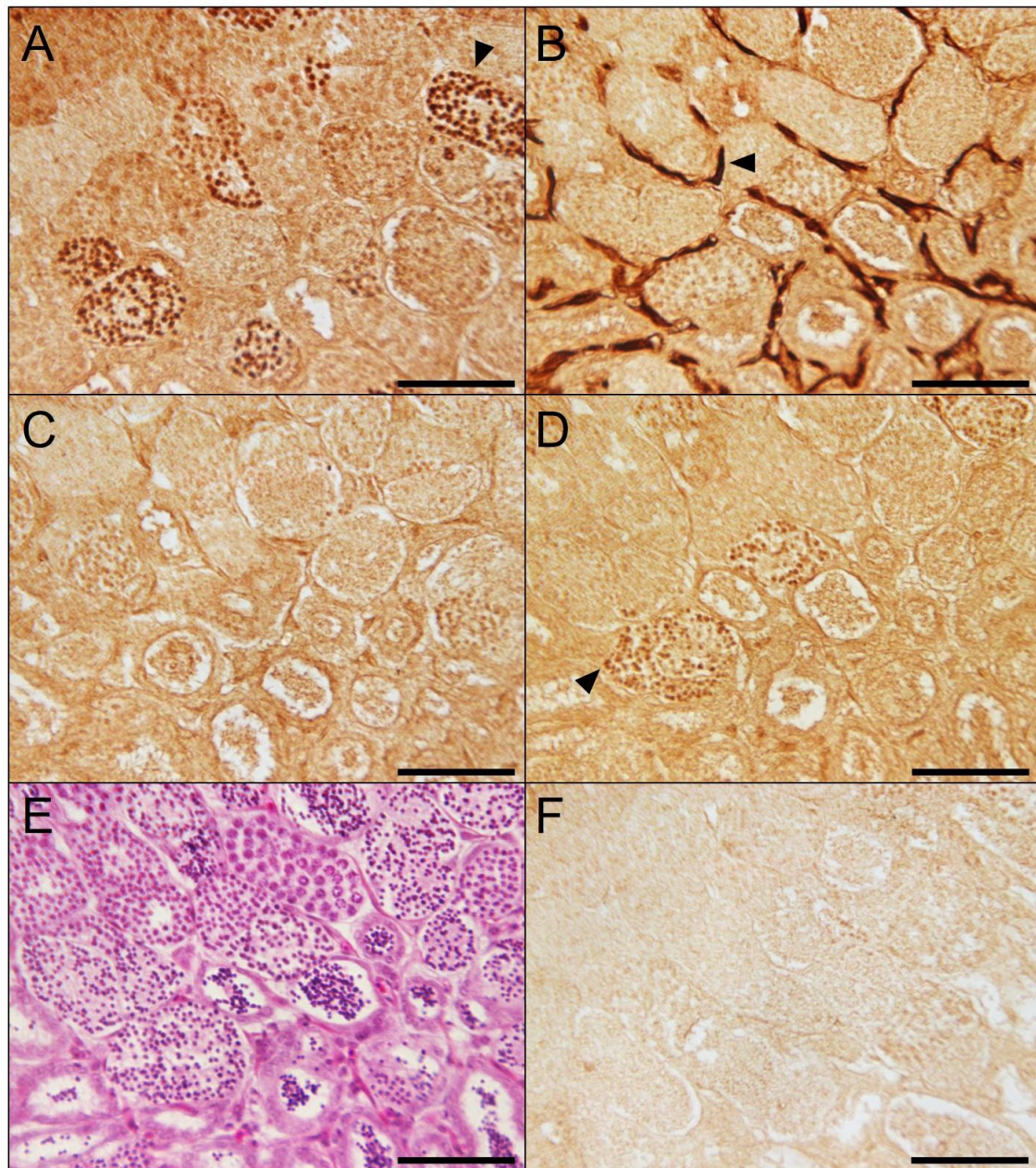


Figure 25. メダカ成魚の精巣における MTNR の発現局在

10L14D の光周期条件の ZT19 のメダカ成魚の精巣切片について、メダカ MTNR 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。(A) は MTNR1a 抗体、(B) は MTNR1b 抗体、(C) は MTNR1c 抗体、(D) は MTNR1d 抗体、(F) は NRS を一次抗体として用いた結果を示し、(E) は HE 染色像を示している。図中の矢頭は各抗体で陽性反応が検出された場所を示す。スケールバー：50  $\mu\text{m}$



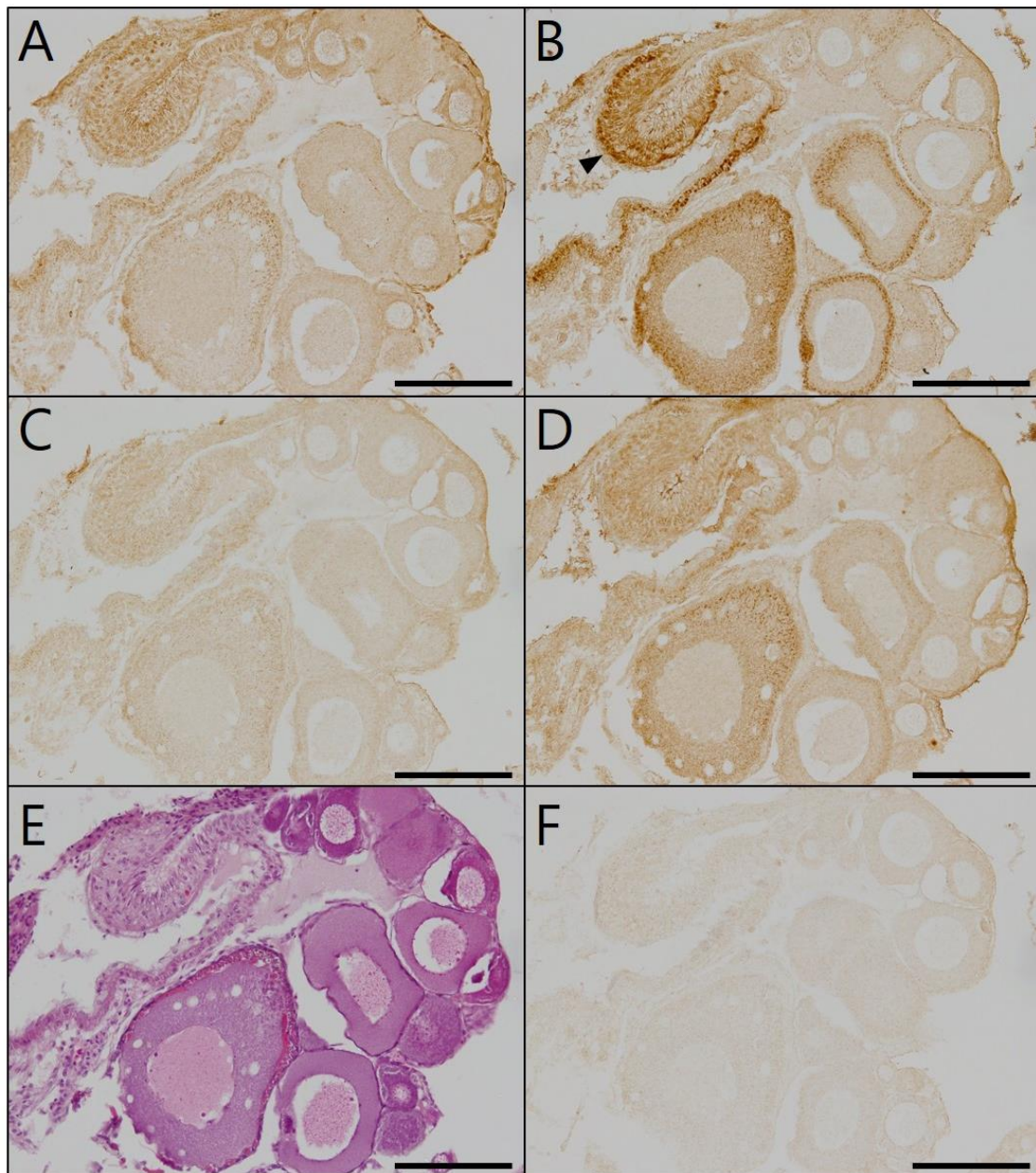


Figure 26. メダカ成魚の卵巣被膜における MTNR の発現局在

10L14D の光周期条件の ZT19 のメダカ成魚の卵巣切片について、メダカ MTNR 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。(A) は MTNR1a 抗体、(B) は MTNR1b 抗体、(C) は MTNR1c 抗体、(D) は MTNR1d 抗体、(F) は NRS を一次抗体として用いた結果を示し、(E) は HE 染色像を示している。図中の矢頭は各抗体で陽性反応が検出された場所を示す。スケールバー：100  $\mu\text{m}$

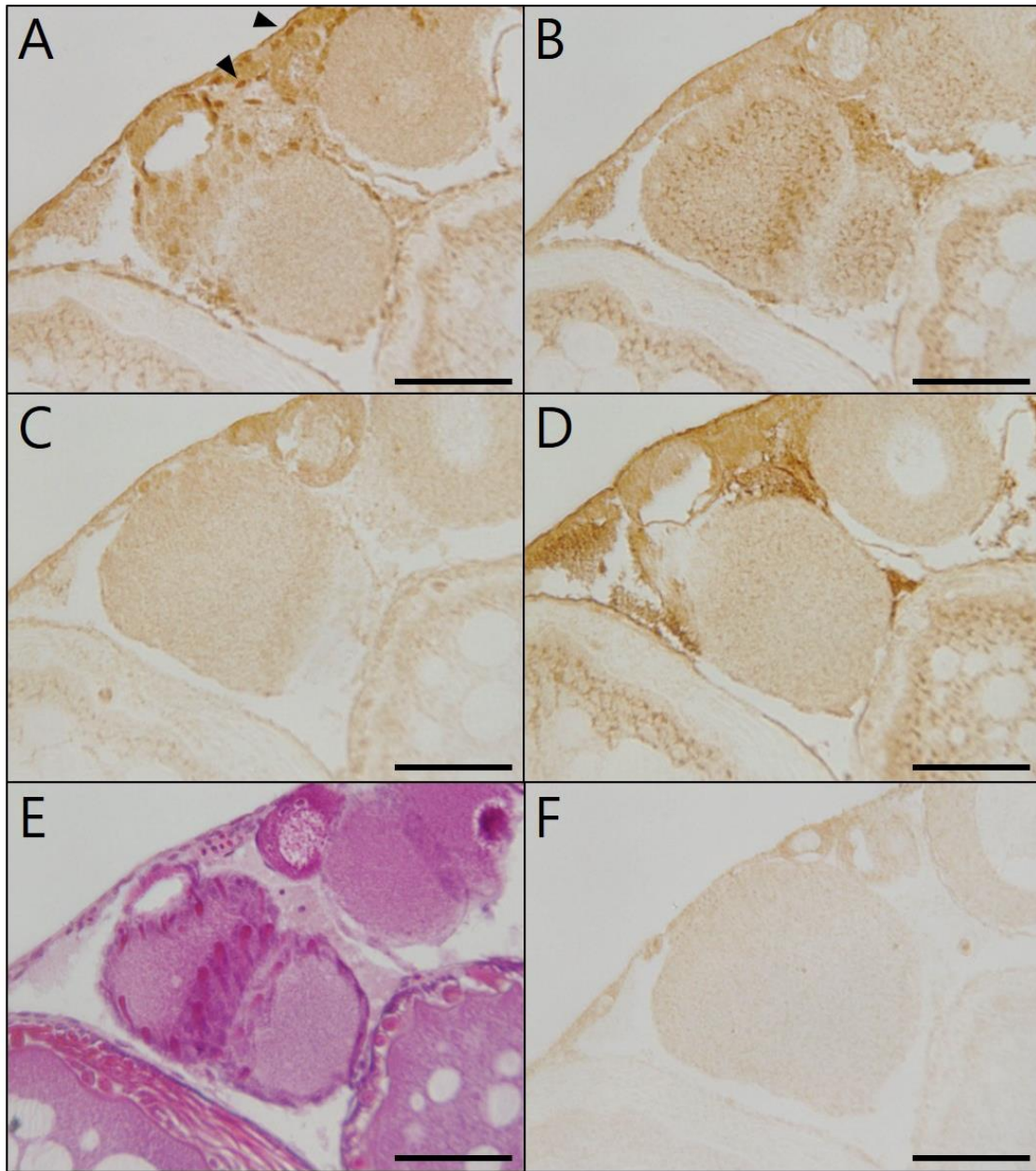


Figure 27. メダカ成魚の卵巣における MTNR の発現局在

10L14D の光周期条件の ZT19 のメダカ成魚の卵巣切片について、メダカ MTNR 抗体を用いて免疫組織化学染色を行った。(A) は MTNR1a 抗体、(B) は MTNR1b 抗体、(C) は MTNR1c 抗体、(D) は MTNR1d 抗体、(F) は NRS を一次抗体として用いた結果を示し、(E) は HE 染色像を示している。図中の矢頭は各抗体で陽性反応が検出された場所を示す。スケールバー：50  $\mu\text{m}$

## 第一章 考察

本章でメダカ成魚に対しメラトニン曝露を行った結果、メラトニン曝露群にはエタノール群と比べて産卵時間に遅延が認められた (Fig. 1A)。このことから、メラトニンはメダカの産卵リズムに影響を与えることが明らかになった。メラトニン自体はフリーラジカルのスカベンジャーとしてはたらく低分子であるが (Reiter *et al.*, 2003)、このメダカの産卵リズムへの影響はスカベンジャー効果によるものとは考えにくく、おそらく情報伝達物質として受容体を介して認められる生理機能であろう。

メラトニンは両親媒性の低分子であり、血液脳関門を通過することが可能である (Johns, 2011)。また、ニジマスにおいて水中に溶けている有機物質の鰓からの取り込みが行われることが報告されている (Schmiedera and Weberb, 1992)。このことから、本章で行ったメラトニンの曝露実験においても、水中のメラトニンが鰓から血中に取り込まれ、松果体で産生される内因性メラトニンと同様に体内を巡り、産卵リズムに影響を及ぼしたと考えられる。

シンテニー解析の結果、メダカの MTNR をコードする遺伝子のシンテニー領域は特に硬骨魚類内で高度に保存されており、爬虫類やニワトリ、ヒトとも共通点が認められた。このことから、メダカの 4 種の *mtnr* は脊椎動物間で保存されている *mtnr* のホモログであることが示唆された。近年まで硬骨魚類でしか *mtnr1d* (*mtnr1a1.4* や *mtnr1a-like* と呼ばれる) に相当する *mtnr* が見つかっていなかったため、この分子種は魚類特異的な全ゲノム倍化で生じた *mtnr* という意見もあった。しかし、本研究におけるシンテニー解析と系統樹解析の結果は、脊椎動物に共通する全ゲノム倍化によって *mtnr1d* がすでに生じていたことを示していることから、前述した *mtnr1d* は魚類特異的な全ゲノム倍化で生じた *mtnr* であるという意見を明確に否定する。一方、哺乳類と鳥類では、魚類の *mtnr1d* の周囲の遺伝子との共通性は残されているものの、*mtnr1d* 自体は見当たらないことから、このサブタイプは失われていることが示された。また、硬骨魚類と鳥では *mtnr1c* のとなりに *vma21* と名付けられた遺伝子が存在する。一方、ヒトを含めた哺乳類では *vma21* は存在するものの、その隣には *mtnr1c* ではなく *GPR50* (G Protein-Coupled Receptor 50) が存在している。ヒトの *GPR50* は 618 個のアミノ酸からなり、7 回膜貫通領

域は MTNR1c と同様に存在しているが、306 番目のアミノ酸残基以降の配列が余分に存在している。さらに、GPR50 は MTNR1c との相同性は高いにもかかわらず、メラトニンの受容体としては機能しない (Reppert *et al.*, 1996)。このことは、哺乳類の GPR50 は *mtnr1c* が急速に変化して生じた遺伝子であることを示している。

メダカ MTNR 発現 Hepa-T1 細胞を用いたレポーターアッセイの結果、cAMP の量に応答する発光はメラトニン濃度依存的に減少した。この結果は、ノーザンパイク (*Esox lucius*) の MTNR がアデニル酸シクラーゼを阻害し、cAMP 産生の減少を引き起こすという報告と一致している (Gaildrat *et al.*, 2002)。メダカの MTNR に対するメラトニンの EC<sub>50</sub> 値は MTNR1c (0.062 nM) < MTNR1a (0.48 nM) < MTNR1b (1.9 nM) < MTNR1d (22 nM) となり、MTNR の種類ごとに大きく異なっていた。Ogiwara and Takahashi (2016) らはメダカの血中メラトニン濃度は、昼間は約 50~100 pg/ml、夜間は約 150~200 pg/ml であると報告している。血中メラトニン濃度は概日リズムに従って大きく変動することを考えると、血中メラトニン濃度によって、それぞれ機能する受容体が異なるという可能性が考えられる。また、血中のメラトニン濃度だけでなく、器官ごとのメラトニン濃度も大きく異なる可能性も存在する。本研究で、メダカにおいてそれぞれの MTNR は器官ごとに異なる局在を示したことから、メラトニンによる情報伝達は、受容体の時空間的な発現と、メラトニンとの最適親和性濃度によって制御されている可能性が提示される。

過去の多くの知見から、哺乳類では網膜や肺、心臓、肝臓、胆のう、腎臓、脾臓、胃、腸、精巣、卵巣、骨髄、甲状腺、気道上皮、真皮、胎盤、内耳の蝸牛などの組織や肥満細胞、NK 細胞、リンパ球など、様々な器官でメラトニンが産生されていることが明らかになっている (Mayo *et al.*, 2018)。魚類でも松果体や網膜以外にも腸や卵巣など、多くの組織や器官でメラトニンが産生されることが示されている (Mukherjee and Maitra, 2015, Ogiwara and Takahashi, 2016)。一方、本研究行われた免疫組織染色 (IHC) 実験において、MTNR1a は脳の SCN、視細胞、網膜の内顆粒層と外顆粒層、血球、尿細



管構成細胞、精細胞、卵母細胞の周辺細胞などに、MTNR1b は視細胞、鰓弁軟骨、尿細管上皮細胞、腸の粘膜固有層、筋組織、精小嚢境界壁、卵巣被膜などに存在していることが示された。また、MTNR1c は網膜の内網状層と血球で、MTNR1d は二次鰓弁、尿細管上皮細胞、腸の粘膜上皮細胞全体などに存在することも明らかになった (Fig. 16-25)。このことは、特定の器官や組織においてはメラトニン産生と受容体発現が同一細胞で行われている可能性を示す。ホルモンとは、従来、産生細胞と受容細胞が異なるエンドクリン型の細胞間シグナル伝達物質を示す。もし、メラトニンの産生細胞と受容細胞が隣接していた場合、または、同一細胞でメラトニン産生と受容体発現が認められる場合は、従来のエンドクリン型細胞間シグナル伝達に加え、パラクリン型やオートクリン型の細胞間情報伝達もメラトニンは行う可能性が高い。各器官における詳細なメラトニン産生細胞と MTNR 発現細胞を同定することで、この問題に答えを得ることができると考える。

また、この様な組織、器官ごとの MTNR サブタイプの発現パターンの違いはキンギョやセネガルシタビラメ (*Solea senegalensis*)、ムツゴロウ (*Boleophthalmus pectinirostris*)、チャイロマルハタ (*Epinephelus coioides*) においても認められている (Ikegami *et al.*, 2009, Confente *et al.*, 2010, Hong *et al.*, 2014, Chai *et al.* 2013)。このことから、MTNR サブタイプの使い分けによってメラトニンの多様な機能発現を誘導するのは、硬骨魚類に共通しているのかもしれない。

メダカ成魚の間脳、視蓋、眼球において経時的に MTNR の mRNA 発現量を定量した結果、発現量は明期に比べて暗期に増加する傾向を示したが、その発現量が極端に低くなることはなかった (Fig. 10-12)。夜間に松果体で合成されたメラトニンは血流にのって組織に到達し、細胞膜に存在する MTNR に結合する。ある程度の間メラトニンのシグナルが細胞内に伝えられた後、MTNR は  $\beta$ -アレクチンなどによって細胞内に引き込まれ、シグナルの脱感作が起こる

(Dupré *et al.*, 2018)。仮に MTNR の夜間の発現量が昼間と変わらない量であったならば、MTNR の脱感作により夜間のメラトニンのシグナルは途切れ途切れになる可能性がある。そのため、夜間には常に新鮮な MTNR をつくり、メラトニンがつくられている時間帯であるという情報を絶えず細胞内に伝達し続

け、厳密な暗期の長さを体内に伝達するために、夜間に *mtnr* の発現量が増加するのかもしれない。

IHC の結果、メダカの腸では MTNR1a の発現が粘膜上皮細胞を構成する一部の細胞に、MTNR1b の発現が粘膜固有層と筋肉層に、MTNR1d の発現が粘膜上皮細胞全体に認められた (Fig. 24)。このことから、メダカにおいて MTNR は腸管におけるメラトニンの複数の機能を、サブタイプ特異的に仲介している可能性がある。メラトニンの曝露を行うことで、産卵の時期が変化することはすでに述べたが、この実験の最中に、メラトニン曝露群では対照群と比較して糞便の量が増加する傾向が認められた。近年、哺乳類ではメラトニンの投与により腸管平滑筋の自然収縮が抑制され腸の伸長が誘発されることや、投与量によって腸の運動に影響を与えることが報告された (Mukherjee and Maitra, 2015)。メダカにおいては筋肉層に特に MTNR1b が存在していることを考えると、メラトニンは腸の筋組織に発現している MTNR1b を介して、腸の蠕動運動などを制御することで、糞便の量の増減に関与している可能性が考えられる。

メラトニン合成の律速酵素である AANAT は、哺乳類で 1 種、硬骨魚類には 3 種のサブタイプが保存されており、それぞれ部位特異的に発現することが報告されている。(Cazaméa-Catalan *et al.* 2014, Falcón *et al.* 2014, Coon *et al.* 1999, Falcón *et al.* 2009)。本章では、メダカにおいて松果腺を含む間脳および眼球において、*aanat1a* は常に一定の発現量を示し、*aanat1b* および *aanat2* の発現量が昼夜で変動することを明らかにした (Fig. 13)。このことから、メダカでも他の生物と同様にメラトニンの合成に概日リズムが存在することが示唆された。さらに長日光周期と短日光周期で *aanat* の発現動態が異なることも明らかになった。ニジマスでは光周期や温度を変化させると血中メラトニンレベルの最大値と増加する時間帯が変化することが報告されている

(Masuda *et al.*, 2003)。メダカでも長日光周期と短日光周期でメラトニンの産生時間や産生量が変わることから、メラトニン含量は、昼夜変化のみならず季節的な変化を感知する情報分子として機能している可能性も考えられる。

哺乳類において核内オーファン受容体の一つである retinoic acid-related orphan receptor (ROR) の a サブタイプ (RORa) は、コレステロールや硫酸コレステロールの他に、メラトニンによって活性化されることが報告されている (Kallen *et al.* 2002, Wiesenberg, *et al.* 1995)。哺乳類の RORa は RORE (ROR responsible element) に結合し、体内時計を形成する時計遺伝子の転写調節に関与することがわかっている (Sato *et al.*, 2004)。一方、魚類ではゼブラフィッシュやソウギョで ROR のクローニングと発現解析が行われているが、魚類の ROR がメラトニンの受容体であるかは不明であった (Flores *et al.*, 2007, Du *et al.*, 2012)。本章で行ったレポーターアッセイでは、メダカの RORa の LBD をもつキメラタンパクは、メラトニン情報を受容せず、魚類特異的な RORd1 のキメラタンパク発現細胞でもメラトニン処理による活性の変動は起こらなかった (Fig. 14A, Fig. 14B)。このことから、メダカの ROR はメラトニンの受容体として機能していないことが初めて明らかになった。この結果は、今後の硬骨魚類におけるメラトニン情報伝達研究に大きな知見を与えるものであろう。

## 第二章

### メダカのメラトニン受容体の機能に関する解析



## 第二章 緒言

前章では、メダカにおいてメラトニンは昼夜リズムを制御する重要な情報伝達物質であり、このメラトニンの生理機能はメダカの4種のMTNRによって仲介されていることを明らかにした。また、各MTNRはサブタイプごとに異なる細胞や器官で発現しており、特にMTNR1aはSCNにおいて発現が認められたことからこの受容体が概日リズムの制御に関与する可能性が示された。各MTNRの機能を明らかにするためには、各受容体の阻害実験が必要であるが、魚類のMTNRに対してはサブタイプ特異的な阻害剤は現在のところ明らかになっていない。そこで、ゲノム編集技術を用いて各MTNRのノックアウトメダカを作製することで、MTNRを介したメラトニンの機能解析を試みることにした。

## 第二章 材料と方法

### 1) CRISPR/Cas9 を用いた MTNR ノックアウト (KO) メダカの作製

#### 1-1) sgRNA の合成

メダカ *mtnr* の標的部位のゲノム編集を行うために、Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription and Screening Systems User Manual (Clontech) に従って single guide-RNA (sgRNA) の合成を行った。

CRISPR/Cas9 の標的配列を選択するにあたり、メダカ *mtnr* のエキソン部分をコードする領域から、オフターゲット作用を低減させるために他の遺伝子と相動性が低い領域を CCTop - CRISPR/Cas9 target online predictor (<https://crispr.cos.uni-heidelberg.de>) を用いて探索し、標的配列を決定した。標的配列に合わせて設計したフォワードプライマーと Guide-it™ sgRNA In Vitro Transcription Kit (Clontech, Cat. No. 631438) を用いて、sgRNA の鋳型となる DNA 鎖を合成し、pGEM-T-Easy Vector (Promega) にクローニングした。配列を確認後、希釈したクローニングベクターを鋳型にして sgRNA 鋳型 DNA の合成に用いたフォワードプライマーと sgRNA 末端配列にコンプリメントになるように設計したリバースプライマー、そして酵素に Tks Gflex™ DNA Polymerase (TaKaRa) を用いて[94°C2分→(98°C10秒、55°C30秒、68°C30秒)X40]の条件で PCR を行うことにより、sgRNA の鋳型部分のみを増幅した。増幅産物をエタノール沈殿後、これを鋳型として sgRNA 合成反応のための反応液 (template 5 µl、DNase/ RNase-free water 5 µl、Buffer 7 µl、T7 RNA Polymerase 3 µl) を調製し、42°C で 4 時間 incubation を行った。反応液は DNase 処理後、sgRNA の精製のために水飽和フェノールクロロホルム処理を行った。エタノール沈殿後、DNase/ RNase-free water に溶解し-80°C に保存した。

【sgRNA の鋳型 DNA の合成と増幅のために設計したプライマー】

---

forward primer

---

MTNR1aKO (69 mer) :

GCGGCCTCTAATACGACTCACTATAGGGGGCTATCTATCCATACCCCC  
GTTTTAGAGCTAGAAATAGCA

---

MTNR1bKO (69 mer) :

GCGGCCTCTAATACGACTCACTATAGGGAAGGGTAGAAGGCTACCACA  
GTTTTAGAGCTAGAAATAGCA

---

MTNR1cKO (69 mer) :

GCGGCCTCTAATACGACTCACTATAGGGGGCACTGTACCCATACCCTC  
GTTTTAGAGCTAGAAATAGCA

---

MTNR1dKO (69 mer) :

GCGGCCTCTAATACGACTCACTATAGGGTTCCACGGCGGCTGGATAGC  
GTTTTAGAGCTAGAAATAGCA

---

reverse primer

---

rTemp. (30 mer) : AAGCTTTAGAAAAAAGCACCGACTCGGTG

---

## 1-2) メダカ受精卵へのマイクロインジェクション

MTNR ノックアウトメダカを作製するにあたり、NBRP Medaka (<https://shigen.nig.ac.jp/medaka/>) から提供していただいた d-rR/TOKYO (系統 ID : MT837) を用いた。氷上で冷やしたシャーレに自然産卵したメダカの受精卵を回収し、ピンセットで付着糸を除いた。卵を固定するために幅および深さが 1mm の溝をつけた 2%アガロースゲル入りシャーレを用意し、細胞質側を上向きにして受精卵を設置した。合成した sgRNA 溶解液 (400 ng/ $\mu$ l) 18  $\mu$ l に対し、4.5  $\mu$ g の Guide-it™ Recombinant Cas9 (Electroporation-Ready) (Clontech) を混ぜ合わせ、ガラス針に充填した。マイクロインジェクションにより 1 細胞期のメダカ胚の細胞質に注入した。インジェクション後の胚 (F<sub>0</sub>) は室温で孵化させ、14L10D の光周期条件下で飼育した。

### 1-3) ジェノタイピング PCR による *mtnr* に変異をもつ個体の選別

F<sub>0</sub> と野生型個体を掛け合わせて得られた子 (F<sub>1</sub>) について、CRISPR/Cas9 の標的部局周辺の配列における変異の有無を調べるために、ジェノタイピング PCR を行った。

孵化後 30 日の F<sub>1</sub> 個体から採取した鱗をいれた 1.5 ml マイクロチューブに 50 mM NaOH を 45  $\mu$ l 加え、95°C のブロックヒーターで 10 分間加熱後、1 M Tris-HCl (pH8.0) を 5  $\mu$ l 加えて vortex し、10,000 rpm で 5 分間遠心分離した。この上清をゲノム抽出液としてジェノタイピング PCR の鋳型に用いた。CRISPR/Cas9 の標的部局を挟むように設計したプライマーと KOD FX (TOYOBO) を用いて、[94°C2 分→(98°C10 秒、アニーリング 30 秒、68°C 30 秒) X40 ]の条件で PCR を行った。各アニーリング温度は *mtnr1a*: 55°C, *mtnr1b*: 52°C, *mtnr1c*: 55°C, *mtnr1d*: 55°C とした。

TBS バッファー内で 12% ポリアクリルアミドゲルにジェノタイピング PCR による増幅産物をアプライし、電圧 100V、電流をゲル 1 枚あたり 16mA に設定の上、C・V で 180 分間電気泳動した。野生型のバンドと異なるバンドが出現した増幅産物について、クローニング後シーケンス解析を行った。

塩基配列にフレームシフト変異が確認できた個体同士を交配させ、得られた子 (F<sub>2</sub>) についても上記と同様のジェノタイピング PCR を行った。10  $\mu$ l の増幅産物のうち、5  $\mu$ l はそのまま電気泳動を行い、残りの 5  $\mu$ l に対し野生型ゲノム由来の増幅産物を 1  $\mu$ l 加え、95°C で 2 分間熱解離させ、さらに 5 分間の急冷後に電気泳動を行った。

増幅産物をそのまま電気泳動したとき、野生型よりもバンドの数が多くなったゲノムをもつ個体は野生型の *mtnr* と変異が存在する *mtnr* をヘテロで持つ個体であると判断した。増幅産物をそのまま電気泳動したときは 1 本のバンドが出るが、野生型のバンドと混ぜ熱処理したときは変異ヘテロ個体と同様のバンドが認められた個体を、ホモで変異を持つ個体 (MTNRKO 個体) とした。野生型と同様のバンドが出現し、かつ野生型ゲノム由来の増幅産物を加え熱処理を行っても、バンドの本数や位置が変化しない個体を、野生型の *mtnr* をもつ個体と判断した。

【ジェノタイピング PCR に用いたプライマー】

---

*mtnr1a*KOcheck

F primer (30 mer) : CTTGCAGTGGCAGACCTTGT

R primer (30 mer) : TGTTGAAGATGGAGCCGATG

---

*mtnr1b*KOcheck

F primer (30 mer) : GTAATGTGTTTGTGGTGAGCCTGG

R primer (30 mer) : GAAGGAATATGGTTTTACCATGCACTGCG

---

*mtnr1c*KOcheck

F primer (30 mer) : CGTGGTGAGCTTGTCTGTGG

R primer (30 mer) : GGAGCCAATGACGCTGATG

---

*mtnr1d*KOcheck

F primer (30 mer) : CTGACTTGGTGGTCGCCATCTACCCGTATC

R primer (30 mer) : GTCATCGGCTCCATCTTCA ACATCACGGG

---

【12% ポリアクリルアミドゲル (ゲル 1 枚当たりの組成)】

---

試薬	必要量
滅菌水	4ml
30 %アクリルアミド水溶液	3.2 ml
10 X TBS バッファー	0.8 ml
10 % ammonium peroxodisulphate 水溶液	90 $\mu$ l
N, N, N', N'- tetramethylethylenediamine	9 $\mu$ l

---

【30 % ポリアクリルアミド (100 ml)】

---

試薬	必要量
アクリルアミド	29 g
bis アクリルアミド	1 g
滅菌水	total vol. 100 ml

---

### 【10 X TBS バッファー (1 L)】

試薬	必要量
Tris(hydroxymethyl)aminomethane	108 g
ホウ酸	55 g
0.5 M EDTA (pH8.0)	40 mL
蒸留水	total vol. 1 L

作製後、オートクレーブ滅菌を行った。

## 2) 変異 MTNR1a (mutated MTNR1a: mMTNR1a) の機能解析

### 2-1) mMTNR1a 発現ベクターの作製

MTNR1aKO メダカの脳から total RNA を抽出し、cDNA を合成した。ORF の増幅を行うにあたり、野生型メダカの *mntnr1a* のクローニングの時に使用したのと同じベクターを使用した。KOD Plus Neo を用いて[94°C2分→(98°C10秒、61°C30秒、68°C1分) X40]の条件で PCR を行うことにより *mntnr1a* の ORF を増幅した。増幅産物は rTaq DNA Polymerase を用いてアデニン付加を行い、pGEM-T Easy vector に TA クローニングした。配列を確認後、*EcoR* I による制限酵素処理を行い、T4 DNA Ligase を用いて pcDNA3.1(+) vector に組み込んだ。再度配列を確認後、これを mMTNR1a 発現ベクターと名付けた。希釈した発現ベクターを鋳型にし、前章で用いたものと同じ fCMV primer および rNeo<sup>r</sup> primer、KOD Plus Neo を用いて、発現ベクターのプロモーターから ORF を含む領域までを、[94°C2分→(98°C10秒、48°C30秒、68°C4分) X40]の条件で PCR を行うことにより直鎖状に増幅した。増幅産物はエタノール沈殿後、ナノドロップで濃度を測定した。

## 2-2) mMTNR1a 一過的発現細胞を用いたレポーターアッセイ

9 cm ディッシュに 80 %コンフルエントになるまで培養した Hepa-E1 細胞をトリプシン処理し、6ml の RDF 培地で懸濁後、24 穴プレートの 6 穴に 500  $\mu$ l ずつ播種した。調整後に室温で 15 分間静置したトランスフェクション液を 50  $\mu$ l ずつ加え、手で軽く振盪させてから 30°C に設定したインキュベーターで 24 時間培養した。培地を除去し、細胞がはがれないように注意しながら PBS で洗浄後、3 穴に FSK 終濃度が  $6.25 \times 10^{-5}$  M、メラトニン終濃度が  $1.00 \times 10^{-7}$  M の活性炭処理 5 % FCS DMEM を 1 ml ずつ加えた。コントロールとして別の 3 穴には FSK 終濃度が  $6.25 \times 10^{-5}$  M でメラトニン溶液と同じ量のエタノールが含まれる活性炭処理 5 % FCS DMEM を 1 ml ずつ加えた。30°C に設定したインキュベーターで 24 時間培養後、液を抜き、100  $\mu$ l の PBS と 25  $\mu$ l の Steady-Glo® Luciferase を加えて室温で 10 分間静置し、発光量測定用 96 穴プレートに全量を移した。ルミノメーターに設置し、5 分後に 10 秒間の積算発光強度を測定した。

### 【一過的トランスフェクション液の組成】

MTNR1a 発現ベクターまたは mMTNR1a 発現ベクター	300 ng
pCRE-luc ベクター	3000 ng
無血清フェノールレッドフリーDMEM	300 $\mu$ l
TransIT-X2®	9.9 $\mu$ l

## 3) 明条件下および暗条件下の行動解析

11L13D の光周期条件下に馴致した野生型の MTNR をもつメダカおよび MTNR1aKO メダカについて、明期の開始から暗期の終了までの 24 時間の行動を連続で記録した。250 ml の飼育水が入った透明なプラスチック容器（縦 91 mm 横 85 mm 奥行 44 mm）に 1 匹ずつメダカを入れ、ビデオカメラ（明期下：Canon, iVIS\_HF21、暗期下：Sony, DCR-SR300）で撮影した。メダカが 10 秒間に 10 mm 以上動かない状態を不動状態と判断した。不動状態が 1 分間または

それ以上の時間継続したとき、睡眠状態と断定する一つの要素とした (Prober *et al.*, 2006)。もうひとつの要素として、1 分間の鰓蓋の開閉回数を計測し、その平均と標準誤差を算出した。給餌は明期を開始して 20 分後と ZT9 に行った。

#### 4) メラトニン曝露と鰓蓋開閉回数の計測

実験のために、d-rR 系統のヒメダカ (野生型、MTNR1aKO、MTNR1bKO) を、10L14D の光周期条件下、 $26^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$  の水温で 4 週間以上馴致した。200 ml の飼育水が入った透明なプラスチック容器 (縦 91 mm 横 85 mm 奥行 44 mm) に、10 mg/ml のメラトニン (Wako) /エタノール溶液を 20  $\mu\text{l}$  加え、よく混ぜた (曝露液中のメラトニン終濃度 : 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。対照群の容器には、200 ml の飼育水に対し 20  $\mu\text{l}$  のエタノールを加えた。容器は地面に対し平行になるように設置した。容器同士の間は黒い画用紙で仕切りを施し、メダカから別個体の様子が見えないようにした。

予定消灯時刻 (ZT10) にメダカを各容器に 1 匹ずつ加え、明期を継続したままビデオカメラ (Canon, iVIS\_HF21) で動画を撮影した。120 分後のメダカについて、1 分間の鰓蓋の開閉回数を計測し、その平均と標準誤差を算出した。また、対照群とメラトニン曝露群の鰓蓋開閉回数について有意差検定 (t-test) を行った。



## 第二章 結果

### 1) CRISPR/Cas9 を用いた MTNR ノックアウト (KO) メダカの作製

メダカにおける MTNR を介したメラトニンの機能を調べるために、ゲノム編集技術を用いて MTNR のノックアウトメダカを作製し、その表現型から MTNR を介したメラトニンの機能についての研究を行うことにした。4 種の *mtnr* について、それぞれ CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集を行った結果、各 *mtnr* の配列上にフレームシフトを誘起する変異をもつメダカの系統を作製することに成功した (Fig. 28F)。

*mtnr1a* に起きた変異は、翻訳開始点の下流 234 塩基目から 238 塩基目に存在する 5 つ連続したシトシンのうち 2 つが欠損するというもので、347 アミノ酸残基のうち 79 番目のプロリンまでは本来と同じアミノ酸が翻訳されるが、それ以降はフレームシフトが起き、166 番目のアミノ酸の後に停止コドンが新たに生じた。

*mtnr1b* に起きた変異は、翻訳開始点の下流 240 塩基目から 248 塩基目の 9 塩基が欠損し、元の配列とは異なる 10 塩基が挿入されており、364 アミノ酸残基のうち 80 番目のアラニンより後ろは本来と異なるアミノ酸が翻訳されるが、98 番目のアミノ酸の後に停止コドンが新たに生じた。

*mtnr1c* に起きた変異は、翻訳開始点の下流 246 塩基目から 252 塩基目の 7 つの塩基が欠損するというもので、82 番目のプロリンの直後に停止コドンが新たに生じた。

*mtnr1d* に起きた変異は、翻訳開始点の下流 385 塩基目から 395 塩基目の 11 塩基が欠損するというもので、354 アミノ酸残基のうち翻訳開始点のメチオニンから 129 番目のグリシンまでは本来と同じアミノ酸が翻訳されるが、それ以降はフレームシフトが起き、216 番目のアミノ酸指定配列の直後に新たな停止コドンが生じた。

これらの変異では N 末端側から 2 つ目の膜貫通領域またはその途中のアミノ酸までは本来の配列と同等のタンパク質が翻訳される。しかし、フレームシフト変異により 2 番目または 3 番目以降の膜貫通領域が形成されないことが推測される。そこで、これらの変異をホモに持つメダカは、翻訳された MTNR が本来の働きを持たないことが予想された (Fig. 28)。

以上のことから、作製したゲノム編集メダカはその変異をホモで持つことで、各 MTNR の機能を欠損すると結論づけ、これ以降これらの変異をホモで持つメダカをそれぞれ MTNR1aKO、MTNR1bKO、MTNR1cKO、MTNR1dKO メダカと呼ぶことにした。

## 2) 変異 MTNR1a (mutated MTNR1a: mMTNR1a) の機能解析

ゲノム編集によって ORF 中に 2 塩基の欠損が生じたメダカ *mntnr1a* (以降 *mmtnr1a*) からは、その塩基配列から 166 個のアミノ酸が連なるタンパク質がつくられると予想されたが、これが機能的な MTNR1a として機能しないことを証明するため、この変異 *mntnr1a* を用いたレポーターアッセイを行った。MTNR1aKO メダカの脳由来の cDNA から *mmtnr1a* の ORF のクローニングし、発現ベクターを作製した。作製したベクターを Hepa-E1 培養細胞に一過的トランスフェクションし、FSK とエタノール、または FSK とメラトニンを加えて 24 時間後の発光量を調べたところ、野生型メダカの MTNR1a 発現細胞ではメラトニンの添加によってエタノール添加群よりも有意な発光量の減少が認められたが、mMTNR1a 発現細胞では 2 群間の発光量に差は認められなかった (Fig. 29)。このことから、変異 *mntnr1a* から転写翻訳されるタンパク質は、メラトニン受容において MTNR1a としての本来の機能を持たないことが明らかになった。

## 3) 明条件下および暗条件下における行動解析

魚類では睡眠様行動時に、運動の低下および呼吸量の減少が知られている。そこで、鰓蓋の開閉回数を計測し、これを呼吸量の減少の指標にすることにした。

まず、野生型メダカにおいて睡眠時と覚醒時に鰓蓋の開閉回数が異なるのかを明らかにするため、11L13D の光周期条件下の野生型メダカについて、明期の間の 2 点 (ZT1, ZT7) および暗期の 2 点 (ZT12, ZT19) における 1 分間の鰓蓋開閉回数を計測した。その結果、平均開閉回数は ZT1 では 243 回、ZT7 では 252

回、暗期開始 1 時間後の ZT12 では 157 回、暗期を開始して 10 時間が経過した ZT21 では 132 回であり、ZT7 から ZT12 に至るまでに 37.8 %減少し、ZT7 と ZT21 の間では 47.6 %の減少が認められたことから、睡眠時と覚醒時に明確な鰓蓋の開閉回数の違いが存在することが示された (Fig. 30A)。また、暗期開始 1 時間後の ZT12 の時点で野生型メダカは不動状態が 1 分間以上続き、その時の鰓蓋開閉回数は多くても 170 回であったことから、1 分間以上の不動状態 (10 秒間に 10 mm 以上移動しない状態) で、鰓蓋の開閉回数が 170 回を下回った時、睡眠状態にあると判断することにした。また、明期から暗期に移行してからの野生型メダカの鰓蓋運動回数の変動から、暗期を開始してから初めて不動の状態が 1 分間以上持続し、且つ 1 分間の鰓蓋開閉回数が 170 回を下回るまでに必要な時間を、睡眠潜時 (Sleeping latency time) と規定した。

このように睡眠についての指標が確立したので、野生型メダカと MTNR1aKO メダカについて各 4 匹ずつの睡眠潜時を調べた。その結果、野生型メダカでは平均 54 分、MTNR1aKO メダカでは 186-370 分と、幅はあるものの野生型の睡眠潜時に対して三倍以上の増加が認められた (Fig. 30B)。このことから、機能的な MTNR1a を持たないメダカは睡眠潜時が増加することが明らかになった。

11L10D の光周期条件下の野生型メダカと MTNR1aKO メダカについて、10 分間の間に 1 分間以上不動状態が持続し且つ鰓蓋開閉回数が 170 回を下回る時間について 10 秒単位で計測を行い、積算値をグラフに示した (Fig. 30C)。その結果、明期 (ZT0~ZT11) では、不動状態は認められるものの、どちらのメダカでも鰓蓋開閉回数が 170 回を下回ることにはなかった。暗期 (ZT11~ZT24) では野生型メダカにおいて長い睡眠状態が認められたことに対し、MTNR1aKO メダカでは短い睡眠時間が多く、睡眠開始からおよそ 3 時間後には、ZT18 の後半から ZT20 の半ばまでの 90 分間に 10 秒以上の不動時間も全く存在しないという、活発な運動を示した。野生型メダカでも ZT18 から ZT19 の 40 分間に活発な時間帯が認められたが、この間においては細かい不動状態が認められた。

また、明期の間の 10 分間に 1 分間以上の不動状態が持続した時間を計測し、同時に鰓蓋開閉回数を記録した。その結果、MTNR1aKO メダカでは野生型メダカに比べ、倍以上の回数の不動期間が認められ、さらに野生型メダカでは ZT0 台を除いて不動時間中の鰓蓋開閉回数が 250 回前後であったのに対し、

MTNR1aKO メダカでは給餌直後の時間を除いて、不動時間中の鰓蓋開閉回数が 232 回を下回った (Fig. 30D)。MTNR1aKO メダカにおいて、暗期の不動時の呼吸数には達しないが、明期の間でも呼吸数の減少を伴う不動状態が認められたことから、明期の間では MTNR1a メダカは野生型メダカよりも高い頻度で浅い睡眠状態にあることが示唆された。

MTNR1aKO メダカの明期の不動時間中の鰓蓋開閉回数は明期の運動中や暗期における鰓蓋開閉回数と異なると予想し、11L13D の光周期条件下の MTNR1a メダカについて、明期の不動時間中と、不動時間を除いた明期の間の 2 点 (ZT1, ZT7) と、暗期の 2 点 (ZT12, ZT19) について 1 分間の鰓蓋開閉回数の計測を行った。平均開閉回数は明期の不動時間中では 210 回、ZT1 では 251 回、ZT7 では 251 回、暗期の ZT12 では 257 回、ZT21 では 134 回であった。しかし、ZT7 と ZT12 の間の差は有意性が認められず、ZT21 では ZT12 に比べ 47.7% まで有意に減少することが認められた (Fig. 30E)。明期の不動時間中の鰓蓋開閉回数は明期の不動時間外に比べて 16.1% の減少が認められたが、暗期を開始して 10 時間が経過した ZT21 程の減少とはならなかった。野生型メダカと MTNR1aKO メダカでは明期と ZT19 における鰓蓋運動回数に差は認められなかったことから、MTNR1a の変異が基本的な睡眠能力に影響していないことも明らかになった。

#### 4) メラトニン曝露と鰓蓋開閉回数の計測

各 KO メダカと野生株の行動解析の結果、MTNR1aKO メダカは睡眠潜時の著しい増加が認められた。メラトニンによる睡眠誘導作用は哺乳類でよく知られており、実際にメラトニン受容体を標的としたヒト用の睡眠薬も販売されている。硬骨魚類でもメラトニンを腹腔内注射することで睡眠が誘導されることが報告されているが、それは MTNR を介しているかは未だ明らかではない。野生型メダカにおいて消灯後 1 時間以内に生じた入眠は、MTNR1a を介したメラトニンに誘導されるものであるのかを調べるため、明条件下におけるメラトニンの曝露実験を行った。

10L14D のメダカについて、予定消灯時間 (ZT10) にエタノールまたはメラ

トニンを曝露し、明条件を継続したまま 2 時間後の鰓の動く回数を数えたところ、エタノールに曝露した野生型のメダカ群のメダカでは一分間に平均 251 回の開閉運動が認められたのに対し、メラトニンを曝露した野生型メダカの鰓蓋は平均 161 回しか開閉されず、メラトニンの曝露によって有意な鰓蓋運動回数の減少が認められた (Fig. 31A)。同様に、MTNR1aKO メダカに対しても、明条件におけるメラトニンの曝露を行ったところ、エタノール曝露群とメラトニン曝露群の鰓の動く回数の平均はそれぞれ 252 回と 254 回であり、メラトニンの曝露によって鰓蓋の開閉回数に有意な変動はみられなかった (Fig. 31B)。一方 MTNR1bKO メダカでは、エタノールを曝露したメダカで一分間に平均 250 回の開閉運動が認められたのに対し、メラトニンを曝露したメダカの鰓蓋では平均 163 回しか開閉されず、メラトニンの曝露によって有意な鰓蓋運動回数の減少が認められた (Fig. 31C)。

これらの結果から、外部からのメラトニンの投与は明条件下のメダカに対し睡眠様行動を引き起こす作用をもつことが明らかになった。さらに、そのメラトニンによる睡眠誘導は MTNR1a が仲介していること、そして MTNR1b は関与していないことが示された。

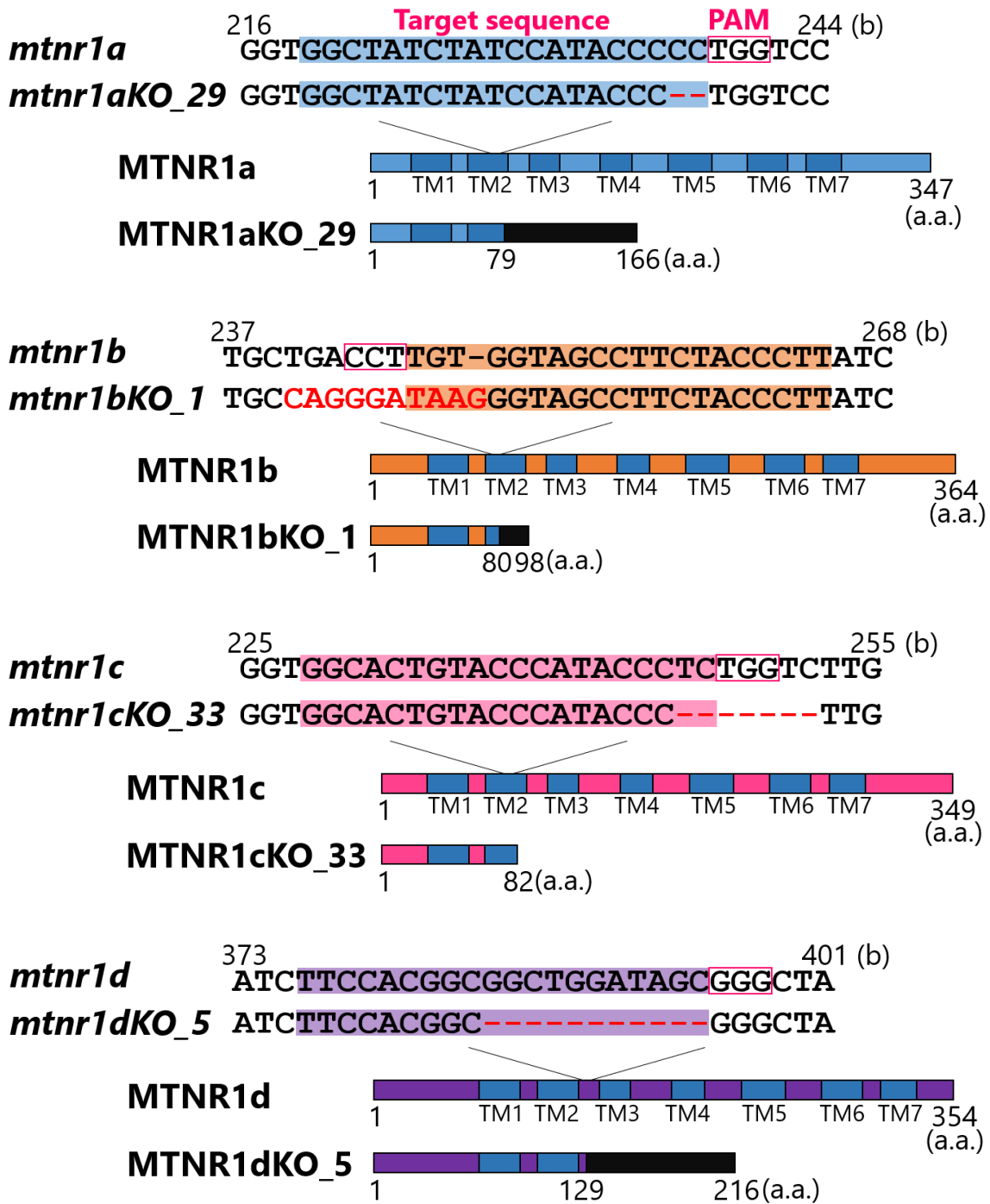


Figure 28. CRISPR/Cas9によるゲノム編集で生じた *mntnr* の変異

各メダカ *mntnr* について、野生型 *mntnr* の推定アミノ酸配列を上段に、変異をもつ *mntnr* の推定アミノ酸配列を下段に示し、フレームシフトにより本来と異なるアミノ酸配列となることが予想される領域を黒色で示す。背景に色があ

る 20 塩基は設計した CRISPR/Cas9 の標的配列を示し、桃色の枠で囲われた 3 塩基は Cas9 タンパク質が認識する PAM 配列 (NGG または CCN) を示す。ゲノム編集により生じた変異について、塩基の欠損を赤色の横線で示し、塩基の挿入を赤字で示す。各 *mtnr* の横に表記された数字は、ジェノタイピングを行った F<sub>1</sub> 個体の親にあたる F<sub>0</sub> の個体番号を示す。TM: Transmembrane domain.

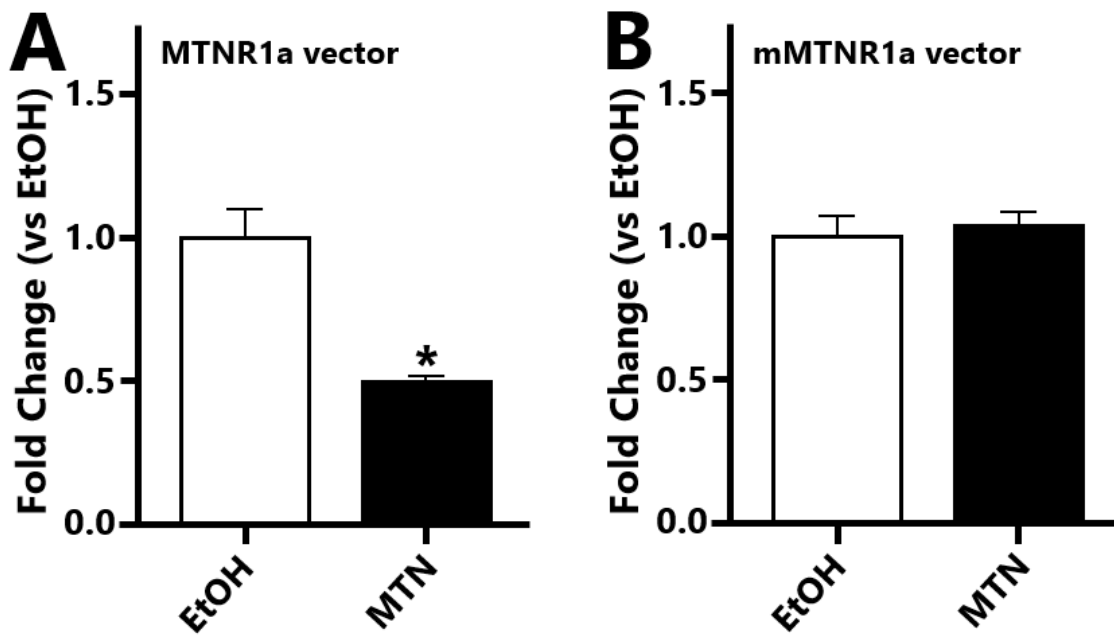
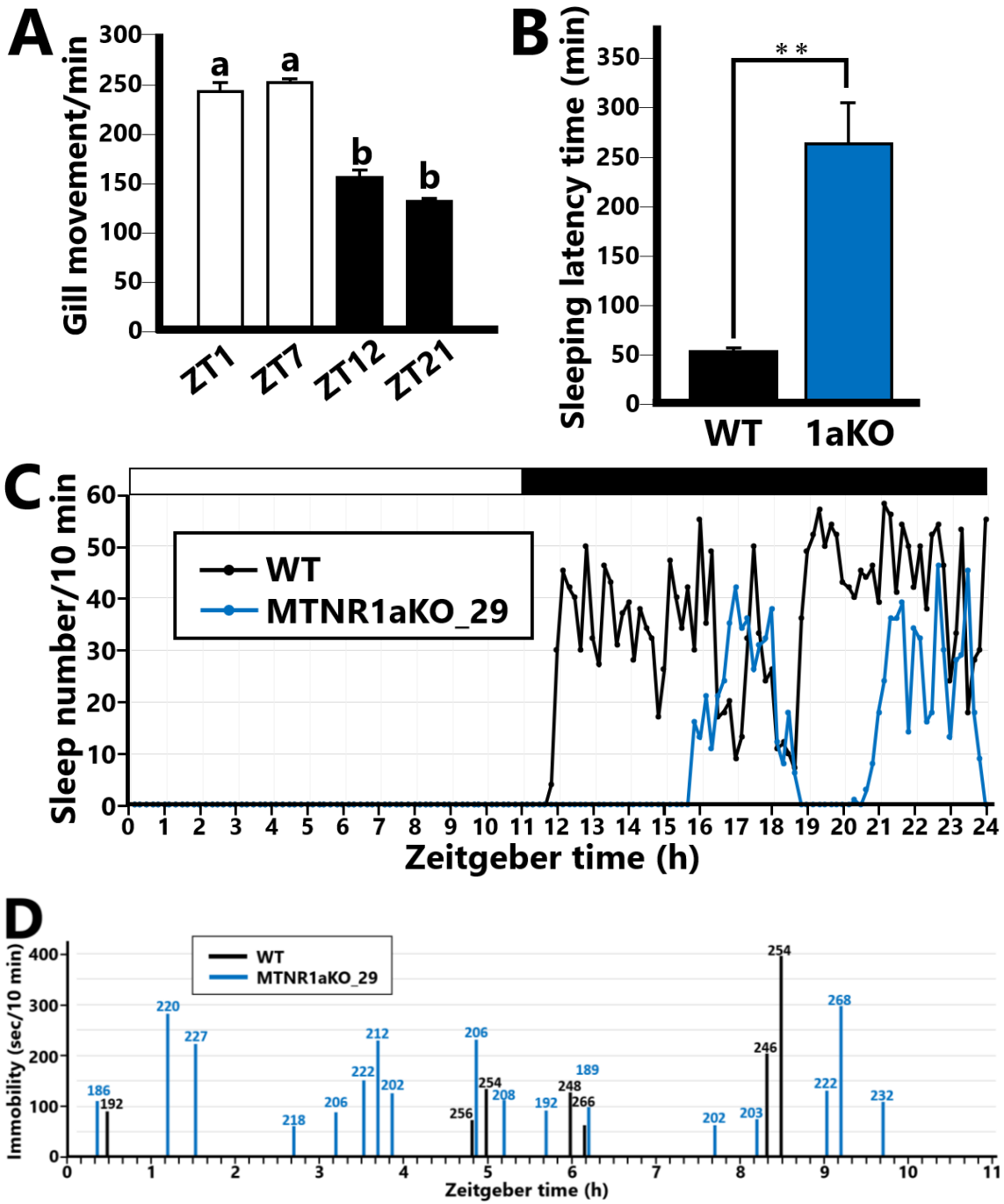


Figure 29. 野生型 MTNR1a と mMTNR1a のメラトニン応答性の比較

野生型 *mntnr1a* (A) と ORF 中に 2 塩基の欠損を持つ *mmtnr1a* (B) について発現ベクターを作製し、Hepa-E1 細胞に一過的に発現させ、レポーターアッセイを行った。縦軸は各サンプルの発光量を対照群であるエタノール添加細胞の発光量で割った相対比を、Fold Change として示した。白色の棒グラフはエタノールを、黒色の棒グラフはメラトニンを加えた細胞の発光量を示す。アスタリスクは 2 群間に有意差があることを示し (t-test, \*:  $P < 0.05$ )、エラーバーは標準誤差を示す。





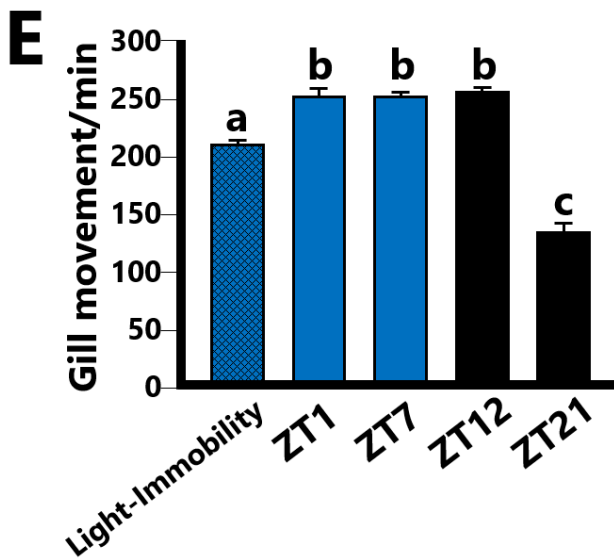


Figure 30. 野生型メダカと MTNR1aKO メダカの鰓蓋開閉回数と行動

(A) 11L13D の異なる時間帯における野生型メダカの 1 分間の鰓蓋開閉回数をグラフに示した。縦軸は鰓蓋開閉回数を示す。白色の棒グラフは明期の、黒色の棒グラフは暗期の鰓蓋開閉運動の平均回数を示す。異なるアルファベットは t-test の結果、それぞれの時間帯の発現量の間有意差が存在することを示し ( $P < 0.001$ )、エラーバーは標準誤差を示す ( $n=4$ )。

(B) 11L13D の野生型メダカと MTNR1aKO メダカの睡眠潜時をグラフに示した。縦軸は暗期を開始してから初めて不動の状態が 1 分以上持続し、且つ 1 分間の鰓蓋開閉回数が 170 回を下回るまでに必要とした時間の平均を示し、エラーバーは標準誤差を示す ( $n=4$ )。アスタリスクは 2 群間に有意差があることを示す (t-test, \*\*:  $P < 0.01$ )。

(C) 11L13D の野生型メダカと MTNR1aKO メダカのある個体について、明期の開始 (ZT0) から暗期の終了 (ZT24) までの睡眠時間をグラフに示した。縦軸は 10 分間の動画中で鰓蓋開閉回数が 170 回以下でかつ不動状態が 10 秒間続いた回数の積算値を示し、横軸は明期開始からの時間を示す。黒の線は野生型の、青の線は MTNR1aKO メダカの睡眠時間を示す。上部の白いバーは明期を、黒いバーは暗期であることを示す。

(D) (C) で示した個体について、明期の間の不動時間とそのときの鰓蓋開閉回数をグラフに示した。縦軸は 10 分間の間に 1 分以上の不動状態が持続した

秒数の積算値を示し、横軸は明期開始からの時間を示す。黒の棒グラフは野生型の、青の棒グラフは MTNR1aKO メダカの不動時間を示し、同色の上部の数字はその際の 1 分間の鰓蓋開閉回数を示している。

(E) 11L13D の異なる時間帯における MTNR1aKO メダカの 1 分間の鰓蓋開閉回数をグラフに示した。縦軸は鰓蓋開閉回数を示す。青色に黒色の網掛けがされた棒グラフは明期の不動時間中の、青色の棒グラフは明期の不動時間を除いた鰓蓋開閉運動の平均回数を、黒色の棒グラフは暗期の鰓蓋開閉運動を示す。異なるアルファベットは t-test の結果、それぞれの時間帯の発現量の間には有意差が存在することを示し ( $P < 0.001$ )、エラーバーは標準誤差を示す ( $n=4$ )。

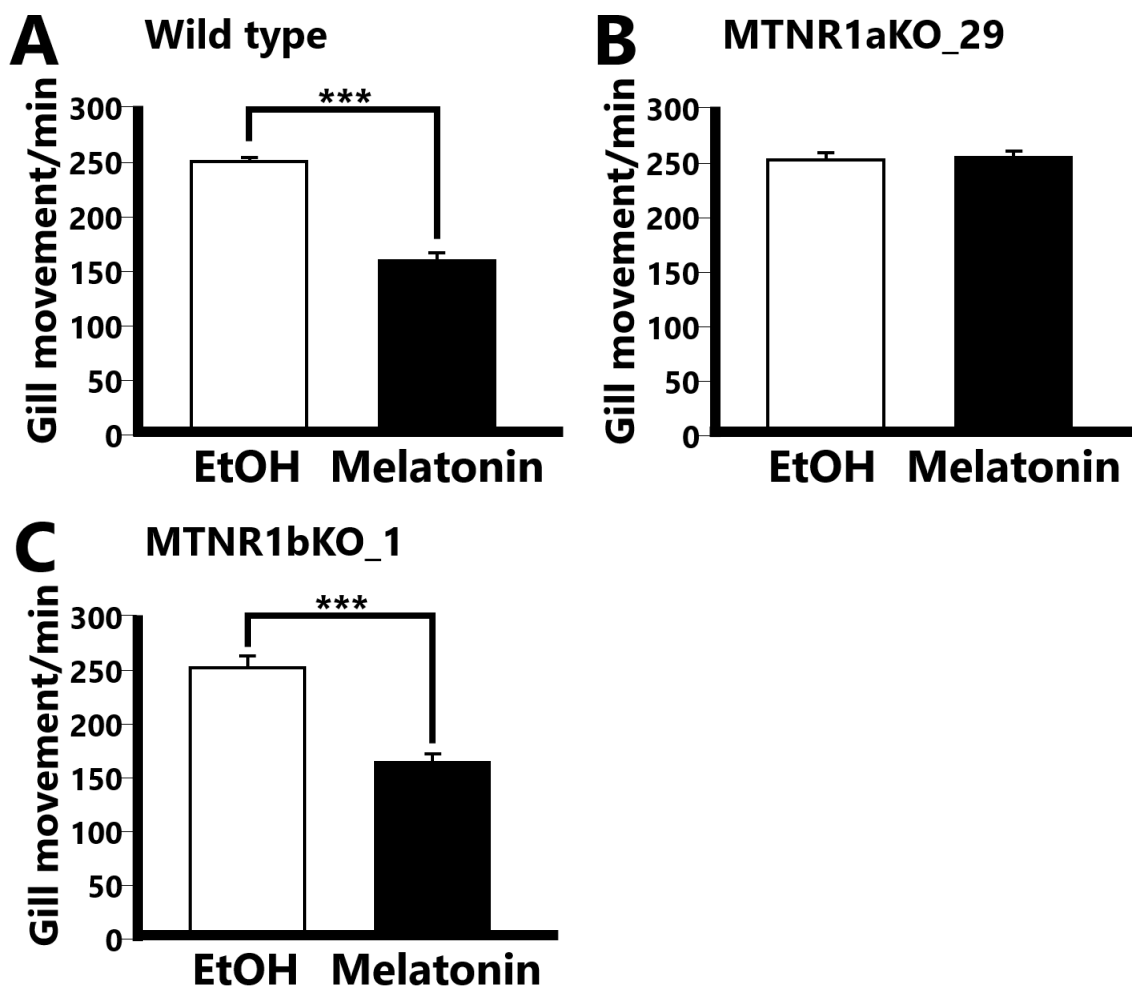


Figure 31. メラトニン曝露による鰓蓋開閉運動への影響

曝露開始後 2 時間が経過した時点における 1 分間の鰓蓋開閉回数をグラフに示した。縦軸は鰓蓋開閉回数を示す。白色の棒グラフはエタノールを、黒色の棒グラフは終濃度 1  $\mu\text{g/ml}$  のメラトニンを曝露したメダカの鰓蓋開閉回数の平均値を示す。エラーバーは標準誤差を示し (n=3)、アスタリスクは 2 群間に有意差があることを示す (t-test, \*\*\*:  $P < 0.001$ )。

## 第二章 考察

ゲノム編集によりメダカの *mtnr1a* に起きた変異は、その ORF 内に存在する連続した 5 つのシトシン (234-238 塩基) の間に生じた 2 塩基の欠損であった。この欠損により、MTNR1a を構成する 347 個のアミノ酸のうち、N 末端側からみて 2 つ目の膜貫通領域に存在する 79 番目のプロリンまでは野生型と同じアミノ酸が翻訳されるが、それ以降は 166 番目のアミノ酸まで野生型と異なるアミノ酸が翻訳されるため、正常な 7 回膜貫通領域は形成されず、おそらく膜への局在性と同時にその受容体としての機能も失われることが推測された。実際に、野生型の *mtnr1a* を導入した培養細胞では認められたメラトニンに応答して起こる発光量の減少が、この 2 塩基の欠損をもつ *mtnr1a* を導入した培養細胞では認められなかった (Fig. 29)。このことから、*mtnr1a* 変異をホモに持つメダカでは MTNR1a の機能喪失を引き起こしていることが示唆された。また、変異 *mtnr1a* と同様に、N 末端側からみて 2 つ目の膜貫通領域の途中から異なるアミノ酸配列を有すると予想される変異 *mtnr1b* または変異 *mtnr1c* についても膜貫通領域と情報伝達に必要な C 末端領域を欠失していることから、この変異をホモに持つメダカにおいても MTNRb または MTNRc の機能が失われていると予想される。実際に、MTNR と同様に 7 回膜貫通型膜受容体であるマウスのドーパミン D2 受容体においても、C 末端が欠失しているだけで既知のリガンドに対する応答性を失っている (Usiello *et al.*, 2000)。本研究で用いたゲノム編集メダカは、すべてマウスのドーパミン D2 受容体の変異体よりもより広範囲の領域を欠損していることから、本研究で得られた 4 種の変異 *mtnr* をホモでもつメダカの各 MTNR はメラトニンを受容し細胞内にシグナルを伝達する機能を喪失していると考えられる。

メダカと同じく昼行性の魚類であるゼブラフィッシュやベラ科の魚において予定消灯時間に消灯せず明条件での飼育を続けると、睡眠が誘導されないが、この時にメラトニンを曝露することで、睡眠が誘導されていることが示されている (Hur *et al.*, 2012, Zhdanova *et al.*, 2001)。メラトニン合成の律速酵素である AANAT の mRNA 量は昼と夜のリズム、すなわち概日リズムによって制御されている。このことは、予定消灯時間後に明条件で飼育すると、AANAT の発現量は概日リズムに従いその発現が上昇すると考えられるが、睡眠誘導は

起きないという矛盾が生じる。これはメラトニン合成の律速酵素である AANAT は光によって構造が変化し、不活性化する特性を持つことから、AANAT の存在量が増加しても光により不活性化するために、内生のメラトニン量は低いままであると考えることができるであろう (Gastel *et al.*, 1998)。事実、恒明条件下に置かれたニジマスでは血中メラトニン濃度が上昇しないことが報告されている (Masuda *et al.*, 2003)。本章で行った野生メダカと *mtnr1a* に変異をホモに持つメダカに対するメラトニンの曝露実験でも、予定消灯時刻を過ぎても明条件を続けたことにより、AANAT の発現量は増加したが光によって不活性化されることで、内生のメラトニン量は低濃度のままであると思われる。それゆえに、この状態の野生メダカにメラトニンを曝露することで、体内のメラトニン量が増加し、睡眠が誘導されたと考えることは妥当であろう (Fig. 31A)。*mtnr1a* 変異をホモに持つメダカにおいても、予定消灯時間に消灯せず明条件での飼育を続けることで、内因性のメラトニン量は少ないままであると考えられる。そこに、メラトニンを曝露して生体内のメラトニン量を増加させても、睡眠が誘導されなかったことは、メラトニンは夜という環境情報を MTNR1a を介して生体内に伝達することで、睡眠を誘発していることを示唆する (Fig. 31B)。

メラトニンの曝露は予定消灯時刻に消灯せず明条件で飼育したときに行った。第一章の各 *mtnr* の mRNA 発現量解析の結果から、各 *mtnr* の発現量もまた概日リズムに従うことが示されているので、この曝露実験中でのメダカの脳や眼球における *mtnr* の mRNA 発現量は十分増加していたことが予想される (Fig. 10-12)。それにも関わらず、MTNR1aKO メダカでは、メラトニンによる鰓蓋開閉回数の減少が認められなかったことから、鰓蓋開閉回数の減少もまたメラトニンが MTNR1a を介して引き起こされているのだろう。一方、MTNR1bKO メダカでも同条件でのメラトニン曝露実験を行ったので、変異 MTNR1b は十分に存在しているにもかかわらず、メラトニン曝露によって睡眠誘導が認められている (Fig. 31C)。第一章の結果から、MTNR1b もメラトニンの情報を伝達する能力を持つので、メダカの MTNR1b はメラトニンによる睡眠誘導には関与しないのであろう。

メラトニンによる睡眠誘導は 4 種の MTNR のなかでも特に MTNR1a を介

して行われていることが強く示唆されたことから、**MTNR1a** のみが発現している細胞が、メラトニンの引き起こす睡眠誘導に関与することが予想される。前章で行った IHC による発現局在解析の結果から、**SCN** において **MTNR1a** 特異的な発現が認められた (Fig. 16A)。魚類では睡眠の中枢であるニューロンはいまだ不明であるが、哺乳類では **SCN** が睡眠覚醒の中枢である視索前野に作用し、さらにマウスでは **SCN** における **MTNR1a** が神経発火を抑制することが報告されている (Bringmann H, 2018, Liu *et al.*, 1997)。しかしながら、夜行性のマウスでは、メラトニンによる睡眠作用は確認されていなかった。本研究で、脊椎動物で初めてメラトニンによって誘導される睡眠様行動が **MTNR1a** を介して行われているという *in vivo* での証拠を示した。**MTNR1aKO** メダカを用いたさらなる研究は、いまだ脊椎動物全般で明らかにされていない、メラトニンが受容体を介して細胞内にシグナルを伝えてから睡眠の誘発に至るまでの分子機構の解明に大きく寄与するものと思われる。

睡眠や覚醒を制御することが知られているオレキシンの受容体をノックアウトしたゼブラフィッシュでは 1 回の睡眠の長さが短くなり、夜間全体の睡眠時間が 30 % 短縮することや、*aanat2* の発現量が減少することが報告されている (Yokogawa *et al.*, 2007, Appelbaum *et al.*, 2009)。また、ゼブラフィッシュの培養松果体にオレキシンを投与するとメラトニン分泌量が 70 % 増加することが報告されている (Appelbaum *et al.*, 2009)。恒暗条件下でも数日間は血中メラトニン量の増減リズムは保たれていることから *aanat* の発現は概日リズムによって制御されている (Klein 2006)。このことは、受容体を介したオレキシンの情報はおそらく体内時計に影響することで *aanat* の発現を制御し、メラトニン合成を制御していると予想される。本章の結果では **MTNR1aKO** メダカにおいて夜間の睡眠時間が減少する傾向が認められた (Fig. 30C)。これは、オレキシン受容体のノックアウトゼブラフィッシュで報告されている夜間の睡眠時間の減少と一致する。このことから、オレキシンによって生合成が制御されたメラトニンが **MTNR1a** を介して睡眠の維持を引き起こす経路が魚類に共通して存在する可能性が示された。また、行動解析の結果、野生型メダカと比較して **MTNR1aKO** メダカでは睡眠潜時の増加が認められた (Fig. 30B)。このことから、メダカにおいて睡眠行動への速やかな移行も **MTNR1a** を介して発現

するメラトニンの機能の一つであることが明らかにされた。MTNR 作動薬であり睡眠導入薬として服用されるラメルテオンについても、健常者や不眠症患者に対して投与した結果、睡眠潜時がプラセボ群と比較して有意に減少し、さらに総睡眠時間の増加も報告されている (Zammit *et al.*, 2005, Erman *et al.*, 2005)。このことから、メラトニンによる睡眠潜時短縮作用は、哺乳類と魚類で共通した効果であると考えられる。

また、MTNR1aKO メダカでは野生型メダカと比べて明期の間頻りに呼吸数の減少を伴う不動時間が認められた (Fig. 30D)。ゼブラフィッシュにおいても、睡眠行動を示すたびに電気的な刺激を与えることにより睡眠を阻害し、さらに暗期を継続したとき、睡眠を阻害された群では電気刺激を与えられなかった群よりも長時間の睡眠様行動を示すことが報告されている (Yokogawa *et al.*, 2007)。明期において野生型メダカでは不動時間が少なく、睡眠様行動は抑制されているが、MTNR1aKO では不動時間が多く、睡眠は抑制されていないことが推察されることから、夜間の休息が十分でないために、昼に睡眠をとることで睡眠の恒常性を調節しているのかもしれない。

メラトニンのもたらす作用は抗がんや抗老化、睡眠誘導などがわかっているが、その作用機序はほとんど不明である。年齢の低下とともに体内のメラトニン濃度が減少することは、高齢者におこる睡眠障害の原因の一つとも言われている (Reiter 1995, Bubenik and Konturek, 2011)。メラトニンは他の既存の睡眠薬と比べても副作用が少なく、睡眠導入薬として非常に優良であるが、天然物質であるため商業化に向かず、現在国内では販売されていない。今後、本研究で作出した MTNR ノックアウトメダカを用いて網羅的発現量解析を行うことにより、メラトニンが MTNR1a を介して睡眠を誘導する詳細なメカニズムについて明らかになれば、睡眠障害を治療する新たな薬の開発につながる可能性がある。

夜勤などの業種のヒトでは、乳がんの発生率が高くなることが報告されており (Hansen and Stevens, 2012)、不規則な睡眠による体内時計の乱れから生じた免疫力の低下が要因ではないかと考えられている。実際に、体内時計を構成する時計遺伝子は免疫に関与する遺伝子の制御を行っていることがわかっている (Silver *et al.*, 2012)。このことから、体内時計により睡眠は制御されるが、定刻の睡眠もまた体内時計が正しく稼働させるためには必要であろう。



MTNR のノックアウトマウスを用いた実験から、哺乳類において MTNR1b は体内時計のシフトに働くことが報告されている (Dubocovich *et al.*, 2005)。これらの知見から、メダカにおいても MTNR1b が睡眠や体内時計の調節に関与すると予想していた。ところが、本章で行った MTNR1bKO メダカに対するメラトニンの曝露実験において野生型メダカと同様にメラトニンによって睡眠が誘導された (Fig. 31C)。このことから、メダカの MTNR1b は睡眠や体内時計の調節には関与していないことが示唆される。前章で行った IHC の結果は、MTNR1b が腸管や卵巣の筋組織にサブタイプ特異的に発現していることを示し (Fig. 24B, Fig. 26B)、腸の蠕動運動や排卵に関与する可能性を示している。実際にラットの腸管に *in vitro* でメラトニンを投与した実験では、メラトニンが腸管平滑筋の収縮頻度には影響しないが、自然収縮力を減衰させることが報告されている (Harlow and Weekley, 1986)。このことから、MTNR の各サブタイプの機能は生物種によって大きく異なるのかもしれない。

本研究で示された新たなメラトニンの機能やその情報伝達機構に関する知見には、これまでの定説を覆すものが多く含まれており、硬骨魚類だけでなく様々な生物種におけるメラトニンの機能解明に貢献すると考えられる。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり、この上なく素晴らしい研究環境を与えていただき、心ゆくまで研究活動をさせてくださった蔡晃植先生に、謹んで御礼申し上げます。日々の研究から博士論文の作成までとても丁寧にご指導いただき、本当に有り難うございます。

博士課程前期課程から博士課程後期課程の間にご指導していただきました池内俊貴先生、山本博章先生、河合靖先生、齊藤修先生に深く感謝いたします。

ノックアウトメダカの作製にあたり、d-rR/TOKYO（系統ID：MT837）を提供していただきましたナショナルバイオリソースプロジェクトメダカ（NBRP Medaka：<https://shigen.nig.ac.jp/medaka/>）の方々にも深く感謝いたします。

日々の研究を進めていくなかで、たくさんのご助言とご協力を頂きました竹花佑介先生、池島信江先生、佐々木真一先生にも、謹んで感謝いたします。

平井洋行先生、近藤真千子先生、神村麻友先生、古川岳人先生、桂木雄也先生にも研究活動について様々な面でご指導とご協力を頂き、厚く御礼申し上げます。また植物分子環境生理学研究室の皆様には、非常に愉快的なラボ生活を送らせていただき、さらに研究活動にもたくさんのご協力を頂きましたこと、とても感謝しております。

最後に、日々応援してくださった先生方や後輩たち、ここまでやりたいことを好きなだけやらせてくれた父上と母上、協力してくれた姉上と山田裕太に、心から感謝いたします。

## 引用文献

Abraham U, Gwinner E, Van't Hof TJ (2000) J Biol Rhythms. 15: 48-56  
Exogenous melatonin reduces the resynchronization time after phase shifts of a nonphotic zeitgeber in the house sparrow (*Passer domesticus*).

Appelbaum L, Wang GX, Maro GS, Mori R, Tovin A, Marin W, Yokogawa T, Kawakami K, Smith SJ, Gothilf Y, Mignot E, Mourrain P (2009) Proc Natl Acad Sci U S A. 106: 21942-21947  
Sleep-wake regulation and hypocretin-melatonin interaction in zebrafish.

Barrett P, Conway S, Morgan PJ (2003) J Pineal Res. 35: 221-230  
Digging deep--structure-function relationships in the melatonin receptor family.

Benarroch EE (2008) Neurology. 71: 594-598  
Suprachiasmatic nucleus and melatonin: reciprocal interactions and clinical correlations.

Ben-Moshe Livne Z, Alon S, Vallone D, Bayleyen Y, Tovin A, Shainer I1, Nisembaum LG, Aviram I1, Smadja-Storz S, Fuentes M, Falcón J, Eisenberg E, Klein DC, Burgess HA, Foulkes NS, Gothilf Y (2016) PLoS Genet 12: e1006445  
Genetically Blocking the Zebrafish Pineal Clock Affects Circadian Behavior.

Bentley GE (2001) Microsc Res Tech. 53: 63-71  
Unraveling the enigma: the role of melatonin in seasonal processes in birds.

Bringmann H (2018) Genetics. 208: 1279-1289  
Sleep-Active Neurons: Conserved Motors of Sleep.

Bubenik GA, Konturek SJ (2011) J Physiol Pharmacol. 62: 13-19  
Melatonin and aging: prospects for human treatment.

Carlberg C, Hooft van Huijsduijnen R, Staple JK, DeLamarter JF, Becker-André M (1994) Mol Endocrinol. 8: 757-770  
RZR<sub>s</sub>, a new family of retinoid-related orphan receptors that function as both monomers and homodimers.

Cazaméa-Catalan D, Besseau L, Falcón J, Magnanou E (2014) PLoS One. 9: e112380  
The timing of Timezyme diversification in vertebrates.

Chai K, Liu X, Zhang Y, Lin H (2013) Mol Reprod Dev. 80: 535-548  
Day-night and reproductive cycle profiles of melatonin receptor, kiss, and gn<sub>rh</sub> expression in orange-spotted grouper (*Epinephelus coioides*).

Confente F, Rendón M, Besseau L, Falcón J, Muñoz-Cueto JA (2010) Gen Comp Endocrinol. 167: 202-214  
Melatonin receptors in a pleuronectiform species, *Solea senegalensis*: Cloning, tissue expression, day-night and seasonal variations.

Coon SL, Bégay V, Deurloo D, Falcón J, Klein DC (1999) J Biol Chem. 274: 9076-9082  
Two arylalkylamine N-acetyltransferase genes mediate melatonin synthesis in fish.

Dawson D, Gibbon S, Singh P (1996) J Pineal Res. 20: 192-197  
The hypothermic effect of melatonin on core body temperature: is more better?

Dollins AB, Zhdanova IV, Wurtman RJ, Lynch HJ, Deng MH (1994) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 1824-1828

Effect of inducing nocturnal serum melatonin concentrations in daytime on sleep, mood, body temperature, and performance.

Du L, Yang X, Yang L, Wang X, Zhang A, Zhou H (2012) *Fish Shellfish Immunol.* 33: 418-426

Molecular evidence for the involvement of ROR $\alpha$  and ROR $\gamma$  in immune response in teleost.

Dubocovich ML, Hudson RL, Sumaya IC, Masana MI, Manna E (2005) *J Pineal Res.* 39: 113-120

Effect of MT1 melatonin receptor deletion on melatonin-mediated phase shift of circadian rhythms in the C57BL/6 mouse.

Dupré C, Bruno O, Bonnaud A, Giganti A, Nosjean O, Legros C, Boutin JA (2018) *Eur J Pharmacol.* 818: 534-544

Assessments of cellular melatonin receptor signaling pathways:  $\beta$ -arrestin recruitment, receptor internalization, and impedance variations.

Erman M, Seiden D, Zammit G, Sainati S, Zhang J (2005) *Sleep Med.* 7: 17-24

An efficacy, safety, and dose-response study of Ramelteon in patients with chronic primary insomnia.

Esteban, M. Á., Cuesta, A., Chaves-Pozo, E., Meseguer, J (2013) *Int J Mol Sci.* 14: 7979-7999

Influence of melatonin on the immune system of fish: a review.

Falcón J, Besseau L, Sauzet S, Boeuf G (2007) Trends Endocrinol Metab. 18: 81-88

Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish.

Falcón J, Besseau L, Fuentès M, Sauzet S, Magnanou E, Boeuf G (2009) Ann N Y Acad Sci. 1163: 101-111

Structural and functional evolution of the pineal melatonin system in vertebrates.

Falcón J, Coon SL, Besseau L, Cazaméa-Catalan D, Fuentès M, Magnanou E, Paulin CH, Boeuf G, Sauzet S, Jørgensen EH, Mazan S, Wolf YI, Koonin EV, Steinbach PJ, Hyodo S, Klein DC (2014) Proc Natl Acad Sci U S A 111: 314-319

Drastic neofunctionalization associated with evolution of the timezyme AANAT 500 Mya.

Farez MF, Mascanfroni ID, Méndez-Huergo SP, Yeste A, Murugaiyan G, Garo LP, Balbuena Aguirre ME, Patel B, Ysrraelit MC, Zhu C, Kuchroo VK, Rabinovich GA, Quintana FJ, Correale J (2015) Cell. 162: 1338-1352

Melatonin Contributes to the Seasonality of Multiple Sclerosis Relapses.

Feng NY, Bass AH (2016) Curr Biol. 26: 2681-2689

"Singing" Fish Rely on Circadian Rhythm and Melatonin for the Timing of Nocturnal Courtship Vocalization.

Flores MV, Hall C, Jury A, Crosier K, Crosier P (2007) Gene Expr Patterns. 7: 535-543

The zebrafish retinoid-related orphan receptor (ror) gene family.

Gaildrat P, Becq F, Falcón J (2002) J Pineal Res. 32: 74-84

First cloning and functional characterization of a melatonin receptor in fish

brain: a novel one?

Gandhi AV, Mosser EA, Oikonomou G, Prober DA (2015) *Neuron*. 85: 1193-1199

Melatonin is required for the circadian regulation of sleep.

Gwinner E (1996) *J Exp Biol*. 199: 39-48

Circadian and circannual programmes in avian migration.

Harlow HJ, Weekley BL (1986) *J Pineal Res*. 3: 277-284

Effect of melatonin on the force of spontaneous contractions of in vitro rat small and large intestine.

Hill SM, Frasch T, Xiang S, Yuan L, Duplessis T, Mao L (2009) *Integr Cancer Ther*. 8: 337-346

Molecular mechanisms of melatonin anticancer effects.

Hirai K, Kita M, Ohta H, Nishikawa H, Fujiwara Y, Ohkawa S, Miyamoto M (2005) *J Biol Rhythms*. 20: 27-37

Ramelteon (TAK-375) accelerates reentrainment of circadian rhythm after a phase advance of the light-dark cycle in rats.

Hong LY, Hong WS, Zhu WB, Shi Q, You XX, Chen SX (2014) *Gen Comp Endocrinol*. 195: 138-150

Cloning and expression of melatonin receptors in the mudskipper *Boleophthalmus pectinirostris*: their role in synchronizing its semilunar spawning rhythm.

Huber R, Deboer T, Schwierin B, Tobler I (1998) *Physiol Behav*. 65: 77-82

Effect of melatonin on sleep and brain temperature in the Djungarian hamster and the rat.

Hur SP, Takeuchi Y, Itoh H, Uchimura M, Takahashi K, Kang HC, Lee YD, Kim SJ, Takemura A (2012) *Gen Comp Endocrinol.* 177: 37-45

Fish sleeping under sandy bottom: interplay of melatonin and clock genes.

Iigo M, Furukawa K, Hattori A, Ohtani-Kaneko R, Hara M, Suzuki T, Tabata M, Aida K (1997) *J Biol Rhythms.* 12: 182-192

Ocular melatonin rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*.

Ikegami T, Azuma K, Nakamura M, Suzuki N, Hattori A, Ando H (2009) *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.* 152: 219-224

Diurnal expressions of four subtypes of melatonin receptor genes in the optic tectum and retina of goldfish.

Johns J (2011) *Bioanal Biomed.* 3: 3

Estimation of Melatonin Blood Brain Barrier Permeability.

Kallen JA, Schlaeppli JM, Bitsch F, Geisse S, Geiser M, Delhon I, Fournier B (2002) *Structure.* 10: 1697-1707.

X-ray structure of the hRORalpha LBD at 1.63 Å: structural and functional data that cholesterol or a cholesterol derivative is the natural ligand of RORalpha.

Kasahara T, Abe K, Mekada K, Yoshiki A, Kato T (2010) *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107: 6412-6417

Genetic variation of melatonin productivity in laboratory mice under domestication.

Kim EB, Fang X, Fushan AA, Huang Z, Lobanov AV, Han L, Marino SM, Sun X, Turanov AA, Yang P, Yim SH, Zhao X, Kasaikina MV, Stoletzki N, Peng C, Polak P, Xiong Z, Kiezun A, Zhu Y, Chen Y, Kryukov GV, Zhang Q, Peshkin L, Yang L, Bronson RT, Buffenstein R, Wang B, Han C, Li Q, Chen L, Zhao W,



Sunyaev SR, Park TJ, Zhang G, Wang J, Gladyshev VN (2011) Nature 479: 223-227

Genome sequencing reveals insights into physiology and longevity of the naked mole rat.

Kulczykowska E (1998) Exp Physiol. 83: 809-820

Effects of arginine vasotocin, isotocin and melatonin on blood pressure in the conscious atlantic cod (*Gadus morhua*): hormonal interactions?

Klein DC (2006) J Biol Chem. 282: 4233-4237

Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme".

Masuda T, Iigo M, Mizusawa K, Naruse M, Oishi T, Aida K, Tabata M (2003)

Zoolog Sci. 20: 1011-1016

Variations in plasma melatonin levels of the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) under various light and temperature conditions.

Lee DA, Andreev A, Truong TV, Chen A, Hill AJ, Oikonomou G1, Pham U, Hong YK, Tran S, Glass L, Sapin V, Engle J, Fraser SE, Prober DA. (2017)

Elife. 6. pii: e25727

Genetic and neuronal regulation of sleep by neuropeptide VF.

Li C, Zhou X (2015) Clin Chim Acta. 446: 175-180

Melatonin and male reproduction.

Li DY, Smith DG, Hardeland R, Yang MY, Xu HL, Zhang L, Yin HD, Zhu Q

(2013) Int J Mol Sci. 14: 11208-11223

Melatonin receptor genes in vertebrates.

Lieberman HR, Waldhauser F, Garfield G, Lynch HJ, Wurtman RJ (1984)  
Brain Res. 323: 201-207

Effects of melatonin on human mood and performance.

Liu C, Weaver DR, Jin X, Shearman LP, Pieschl RL, Gribkoff VK, Reppert SM  
(1997) Neuron. 19: 91-102

Molecular dissection of two distinct actions of melatonin on the  
suprachiasmatic circadian clock.

Louis A, Muffato M, Roest Crolius H (2013) Nucleic Acids Res. 41: D700-705  
Genomicus: five genome browsers for comparative genomics in eukaryota.

Mayo JC, Aguado A, Cernuda-Cernuda R, Álvarez-Artime A, Cepas V, Quirós-  
González I, Hevia D, Sáinz RM (2018) Molecules. 23: E1999

Melatonin Uptake by Cells: An Answer to Its Relationship with Glucose?

Mühlbauer E, Gross E, Labucay K, Wolgast S, Peschke E (2009) Eur J  
Pharmacol. 606: 61-71

Loss of melatonin signalling and its impact on circadian rhythms in mouse  
organs regulating blood glucose.

Mukherjee S, Maitra SK (2015) Front Endocrinol (Lausanne) 6: 112

Gut Melatonin in Vertebrates: Chronobiology and Physiology.

Ogiwara K, Takahashi T (2016) Biol Reprod. 94: 64

A Dual Role for Melatonin in Medaka Ovulation: Ensuring Prostaglandin  
Synthesis and Actin Cytoskeleton Rearrangement in Follicular Cells.

Peng C, Hong X, Chen W, Zhang H, Tan L, Wang X, Ding Y, He J (2017)  
Neurosci Lett. 638: 76-82

Melatonin ameliorates amygdala-dependent emotional memory deficits in

Tg2576 mice by up-regulating the CREB/c-Fos pathway.

Prober DA, Rihel J, Onah AA, Sung RJ, Schier AF (2006) *J Neurosci.* 26: 13400-13410

Hypocretin/orexin overexpression induces an insomnia-like phenotype in zebrafish.

Rawashdeh O, de Borsetti NH, Roman G, Cahill GM (2007) *Science.* 318: 1144-1146

Melatonin suppresses nighttime memory formation in zebrafish.

Reppert SM, Weaver DR (1995) *Cell.* 83: 1059-1062

Melatonin madness.

Reppert SM, Weaver DR, Ebisawa T, Mahle CD, Kolakowski LF Jr (1996) *FEBS Lett.* 386: 219-224

Cloning of a melatonin-related receptor from human pituitary.

Reiter RJ (1995) *Exp Gerontol.* 1995 30: 199-212

The pineal gland and melatonin in relation to aging: a summary of the theories and of the data.

Reiter RJ, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Leon J, Czarnocki Z (2003) *Acta Biochim Pol.* 50: 1129-1146

Melatonin as an antioxidant: biochemical mechanisms and pathophysiological implications in humans.

Roseboom PH, Namboodiri MA, Zimonjic DB, Popescu NC, Rodriguez IR, Gastel JA, Klein DC (1998) *Brain Res Mol Brain Res.* 63: 189-197

Natural melatonin 'knockdown' in C57BL/6J mice: rare mechanism truncates serotonin N-acetyltransferase.

Sato TK, Panda S, Miraglia LJ, Reyes TM, Rudic RD, McNamara P, Naik KA, FitzGerald GA, Kay SA, Hogenesch JB (2004) *Neuron*. 43: 527-537

A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock.

Schmieder PK, Weberb LJ (1992) *Aquat Toxicol*. 24: 103-121

Blood and water flow limitations on gill uptake of organic chemicals in the rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*).

Silver AC, Arjona A, Walker WE, Fikrig E (2012) *Immunity*. 36: 251-261

The circadian clock controls toll-like receptor 9-mediated innate and adaptive immunity.

Srinivasan V, Pandi-Perumal SR, Trahkt I, Spence DW, Poeggeler B, Hardeland R, Cardinali DP (2009) *Int J Neurosci*. 119: 821-846.

Melatonin and melatonergic drugs on sleep: possible mechanisms of action.

Takahashi Y, Kipnis DM, Daughaday WH (1968) *J Clin Invest*. 47: 2079-2090

Growth hormone secretion during sleep.

Taniguti EH, Ferreira YS, Stupp IJV, Fraga-Junior EB, Mendonça CB, Rossi FL, Ynoue HN, Doneda DL, Lopes L, Lima E, Buss ZS, Vandresen-Filho S (2018) *Physiol Behav*. 188: 270-275

Neuroprotective effect of melatonin against lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior in mice.

Usiello A, Baik JH, Rougé-Pont F, Picetti R, Dierich A, LeMeur M, Piazza PV, Borrelli E (2000) *Nature*. 408: 199-203

Distinct functions of the two isoforms of dopamine D2 receptors.

Yokogawa T, Marin W, Faraco J, Pézeron G, Appelbaum L, Zhang J, Rosa F, Mourrain P, Mignot E (2007) *PLoS Biol.* 5: e277.

Characterization of sleep in zebrafish and insomnia in hypocretin receptor mutants.

Valentinuzzi VS, Scarbrough K, Takahashi JS, Turek FW (1997) *Am J Physiol.* 273: R1957-1964

Effects of aging on the circadian rhythm of wheel-running activity in C57BL/6 mice.

Van Den Heuvel CJ, Reid KJ, Dawson D (1997) *Physiol Behav.* 61: 795-802  
Effect of atenolol on nocturnal sleep and temperature in young men: reversal by pharmacological doses of melatonin.

Wiesenberg I, Missbach M, Kahlen JP, Schröder M, Carlberg C (1995) *Nucleic Acids Res.* 23: 327-333

Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand.

Wood S, Loudon A (2014) *J Endocrinol.* 222: 39-59

Clocks for all seasons: unwinding the roles and mechanisms of circadian and interval timers in the hypothalamus and pituitary.

Zammit G, Erman M, Wang-Weigand S, Sainati S, Zhang J, Roth T (2007) *J Clin Sleep Med.* 3: 495-504

Evaluation of the efficacy and safety of ramelteon in subjects with chronic insomnia.

Zhdanova IV, Wang SY, Leclair OU, Danilova NP (2001) Brain Res. 903: 263-268

Melatonin promotes sleep-like state in zebrafish.

Zhdanova IV, Geiger DA, Schwagerl AL, Leclair OU, Killiany R, Taylor JA, Rosene DL, Moss MB, Madras BK (2002) Physiol Behav. 75: 523-529

Melatonin promotes sleep in three species of diurnal nonhuman primates.

服部淳彦 (2017) 比較生理生物学 34: 2-11

メラトニンとエイジング

## 論文目録

Sakai K, Fukushima H, Yamamoto Y, Ikeuchi T (2017) *Zoological Lett.* 3: 11  
A fourth subtype of retinoic acid receptor-related orphan receptors is activated by oxidized all-trans retinoic acid in medaka (*Oryzias latipes*).

Sakai K, Yamamoto Y, Ikeuchi T (2019) *Sci Rep.* 9: 9465  
Vertebrates originally possess four functional subtypes of G protein-coupled melatonin receptor.