

(様式第3号)

## 論文要旨

### 論文題目

“Physiological studies on internal and external regulation of melatonin production in fish pineal gland”

「熱帯性魚類の松果体におけるメラトニン分泌調節要因の生理学的研究」

The aim of the present study is to clarify involvement of external and internal factors in melatonin production in the pineal gland of golden rabbitfish *Siganus guttatus* and Mozambique tilapia *Oreochromis mossambicus*, which inhabit different aquatic environments. Melatonin production in the cannulated rabbitfishes and tilapias were measured at 3-h intervals; it fluctuated daily, with a nocturnal increase and a diurnal decrease. Exposing the cannulated fish to several light intensities (1500–0.1 lx) and to natural light (0.3 lx) suppressed melatonin levels within 30 min. Under light-dark (LD) cycles, melatonin secretion from the isolated pineal gland of golden rabbitfish increased during the dark phase. Melatonin secretion from the pineal gland was suppressed under continuous light conditions, while culture of the pineal gland under continuous dark conditions seemed to duplicate melatonin secretion corresponding to the LD cycles in which the fish were acclimated. When cultured pineal gland was kept under natural light conditions on the dates of the full and the new moon, small amounts of melatonin were secreted at night. Moreover, exposure of the cultured pineal gland to artificial and natural light conditions resulted in a decrease of melatonin secretion within 2 h. On the other hand, rhythmic melatonin synthesis disappeared on pineal gland culture of tilapia under constant dark and light conditions. After ophthalmectomy, plasma melatonin levels did not vary with LD cycles in tilapia. These results suggest that the pineal gland of golden rabbitfish possesses strong photic responsiveness with circadian rhythmicity, while that of tilapia is sensitive to light but lack circadian pacemaker activity. Involvement of cortisol in melatonin synthesis in the pineal gland of the tilapia was examined. *In vitro* culture of the pineal gland with cortisol at a stress level (100 ng/mL), but not at a physiological level (10 ng/mL), resulted in a significant decrease in melatonin secretion into the culture medium. No change in circulating melatonin was observed when the fish were reared under stress conditions, although significant increase in circulating cortisol was evident. Quantitative real-time polymerase-chain reaction (PCR) revealed that glucocorticoid receptor (GR) mRNA is expressed in the pineal gland and fluctuates daily with increases at 0600, 1800, and 0000 h and a decrease at 1200 h. Neither culturing the pineal gland with cortisol at the stress level nor rearing the fish under stress condition alters GR mRNA abundance in the pineal gland. Effect of sex steroid hormones on melatonin production in the cultured pineal gland was also examined. Reverse transcriptase-PCR analyses showed that two estrogen receptors (ER $\alpha$  and ER $\beta$ ) and two androgen receptors (AR $\alpha$  and ER $\beta$ ) are all expressed in this gland. An increase in the mRNA expression levels of ER $\beta$ , but not ER $\alpha$ , was observed by addition of estradiol-17 $\beta$  (E2) to the medium at 10<sup>-7</sup> M. Incubation of the pineal gland with E2 and 11-ketotestosterone (11-KT) for 6 h resulted in elevation of melatonin content in the medium with a dose-dependent manner. It was suggested that the fish pineal gland is targeted by the steroid hormones and its melatonin synthesis is affected by physiological conditions of the fish. Relatively high cytochrome P450c17 (CYP 17) mRNA was expressed in the female pineal gland but not in the male one. It is suggested that the pineal gland secretes steroids in relation to sex specific or reproductive stage specific events. It is concluded that the fish pineal gland has multi-roles in the hypothalamus-pituitary-interrenal/gonadal axes, which plays important roles in stress responses and reproductive activities.

氏名 二階堂 良亮

平成21年 2月16日

琉球大学大学院  
理工学研究科長 殿

論文審査委員

主査 氏名 中村 將  
副査 氏名 日高 道雄  
副査 氏名 池田 讓  
副査 氏名 竹村 明洋



学位（博士）論文審査及び最終試験の終了報告書

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

記

申請者	専攻名 海洋環境学専攻 氏名 二階堂良亮 学籍番号 058559K	
指導教員名	中村 將	
成績評価	学位論文 <input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格	最終試験 <input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格
論文題目	Physiological studies on internal and external regulation of melatonin production in fish pineal gland 熱帯性魚類の松果体におけるメラトニン分泌調節要因の生理学的研究	
審査要旨（2000字以内）	この研究は、魚類の光受容器官である松果体におけるインドールアミン系ホルモン（メラトニン）の合成に関わる外因性及び内因性要因の影響を明らかにすることを目的として行われた。沖縄島河川に広く分布するテラピア（ <i>Oreochromis mossambicus</i> ）を実験魚として用い、外部要因として光とストレス、内的要因としてステロイドホルモンの影響を生理学的および分子生物学的手法で調べた。得られた研究成果の概要は以下の通りである。	

(次頁へ続く)

## 審査要旨

1. テラピアの腹部大動脈にカニューレを挿入し、メラトニンの日内変動を個体ごとに調べ、血中メラトニン量が明期に低く暗期に高くなることを示すとともに、月光程度の光でその産生量が抑制されることを明らかにした。生体外培養した松果体は外部環境光に反応しなかった。また、両眼摘出や視神経切除は血中メラトニン量の明暗変動に影響を与えなかった。
2. 松果体にグルココルチコイド受容体が発現していることを RT-PCR 法で明らかにし、ストレスホルモンであるコルチゾルが松果体の生理作用に影響を与えることを示した。この結果を基に、松果体をコルチゾルと共に培養し、ストレスレベルのコルチゾルが松果体におけるメラトニン産生量を抑制することを明らかにした。また、高密度飼育ストレスを魚に与えることで夜間の血中コルチゾルが増加し、逆に同メラトニン量減少を示した。
3. 松果体に雌性ホルモン受容体と雄性ホルモン受容体が発現していることを RT-PCR 法で明らかにし、性ホルモンが松果体に何らかの生理作用を及ぼしていることを示した。この結果を基に、松果体を雌性ホルモン (Estradiol-17 $\beta$ )、もしくは雄性ホルモン (11-Ketotestosterone) と共に培養し、これらの性ホルモンが濃度依存的に松果体におけるメラトニン産生量を増加させることを明らかにした。
4. ステロイド合成酵素 (CYP17) 遺伝子が松果体に発現していることを RT-PCR 法で示し、松果体がステロイドホルモンを産生している可能性を示した。

魚類では、松果体によっ感受された光が同器官からのメラトニン産生を制御していると考えられてきた。しかし本研究は、テラピアの松果体には生物時計がなく、眼から受けた光が血中メラトニンの変動に大きく影響を与えること (哺乳類型) を明らかにした。また、松果体におけるメラトニン産生にストレスや生殖などが大きく影響し、魚の生理的状態によってメラトニンの日内変動幅が左右される事を示した。さらに、松果体はステロイドホルモンの標的器官であるばかりでなく、ステロイドホルモンを産生してきた以上、多機能な内分泌器官であり、外部環境を内因性のリズムに転換するセンサーの役割以外に、ホルモン力スケードの最上位に位置する可能性も示し、松果体の生理機能の概要解明に道筋をつけた。このような成果は、魚類をはじめ脊椎動物の環境適応に重要な情報を時間生物学の基礎的な分野に提供するばかりでなく、人為的環境による水産物のリズム制御を通しての水産振興に貢献するものと期待される。

学位論文の一部は2編の論文としてまとめられ、すでに掲載発表済みである。これらは全て査読付き英文国際学術誌であり、内容に関する評価をすでに受けている。申請学位論文を各論文審査委員が熟読した後、学位論文審査会を開いて内容の検討を行った。その結果、審査委員の全会一致で申請学位論文の成績は十分に「合」に値するという結論に至った。

平成21年2月13日午後4時より、学位論文の内容に関する学力確認を理学部複合等202教室にて行った。最終試験としてパワーポイントによるコンピュータプレゼンテーションによる40分間の口頭発表と、発表内容に関する質疑応答を20分間行った。平易な言葉でプレゼンテーションを行うとともに質問に対して適切に回答をしていた。論文審査委員会は、博士課程修了者としての十分な学力を有していると判断し、「合」に値するという結論に至った。

以上のことから、本論文は海洋環境学専攻における博士の学位論文として十分価値のあるものであると判断された。論文審査委員会は全会一致で「合格」とした。