

論 文 要 旨

論 文 題 目

Studies on a mechanism of the photoperiodic signal transduction in the ovarian development of the sapphire devil, *Chrysiptera cyanea*

Ovarian development of the sapphire devil, *Chrysiptera cyanea*, exhibits photoperiodism and is stimulated under long day conditions. This photoperiodic ovarian development could be induced even in the ophthalmectomized fish, suggesting the involvement of extra-retinal photoreceptor in the transduction of photic stimuli to the reproductive endocrine axis. Moreover, long photoperiod of red and green light could induce the ovarian development of the fish. The aim of the present study is to identify the candidate molecules of the deep brain photoreceptor involved in the photoperiodic ovarian development and to investigate the photoperiodic time measurement mechanism in the sapphire devil. PCR-based cloning method resulted that eight opsin family genes were isolated from the eye and brain of the sapphire devil; long-wavelength sensitive cone opsin (sdLWS), VA opsin (sdVAL), exo-rhodopsin (sdExo), short-wavelength sensitive cone opsin 1 (sdSWS1), middle-wavelength sensitive cone opsin 1 and 2 (sdMWS1, sdMWS2), rhodopsin (sdRhod), and melanopsin (sdOpn4). RT-PCR analysis revealed that sdLWS, sdVAL, sdRhod, sdExo, and sdOpn4 were expressed in the brain. In addition, in situ hybridization and immunohistochemistry indicated that sdLWS is expressed in the third ventricle periventricular area in the anterior hypothalamus, and that sdVAL-ir cells were localized in the dorsal part of the lateral tuberal nucleus in the hypothalamus. The potential spectral sensitivity of these opsins seemed to be consistent with that of the photoperiodic ovarian development. These results suggest that sapphire devil have several functional opsin-based photoreceptors in the brain and multiple opsin-based brain photoreceptor may be involved in the photoperiodic response of ovary in the sapphire devil. The long photoperiod dependent ovarian development of the sapphire devil could be induced even under short photoperiod with 1 hour light pulse from ZT 12 to ZT 13 with red LED. This result indicates the existence of a photoinducible phase in the photoperiodic ovarian development of this species. Realtime qPCR revealed that the expression patterns of clock genes in the brain were stable under long and short photoperiod, implying that such stable expression pattern may enable the sapphire devil to retain information about temporal changes in light and maintain a photoinducible phase. Taken together, it is possible to propose the machinery of seasonal recognition of the sapphire devil, in which red and green light stimuli during the photoinducible phase detected by the opsin-based photoreceptor in the hypothalamus could activate the reproductive endocrine axis in the sapphire devil.

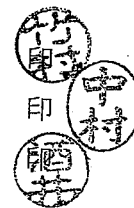
氏 名 竹内 悠記

平成24年 2月 14日

琉球大学大学院
理工学研究科長 殿

論文審査委員

主査 氏名 竹村明洋
副査 氏名 中村 将
副査 氏名 酒井一彦



学位（博士）論文審査及び最終試験の終了報告書

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

記

申請者	専攻名 海洋環境学 氏名 竹内悠記 学籍番号 098605E	
指導教員名	竹村明洋	
成績評価	学位論文 <input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格	最終試験 <input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格
論文題目	Studies on a mechanism of the photoperiodic signal transduction in the ovarian development of the sapphire devil, <i>Chrysiptera cyanea</i> (ルリスズメダイの光周性卵巣発達における光周期情報伝達機構に関する研究)	
審査要旨 (2000字以内)		
<p>熱帯・亜熱帯のサンゴ礁域に広く生息するスズメダイ科の魚類であるルリスズメダイ (<i>Chrysiptera cyanea</i>) は光応答性の繁殖年周リズムをもち、長日条件下で生殖腺を発達させて活発な産卵を繰り返す。本研究は、ルリスズメダイの示す光周性繁殖リズムに着目し、本種の繁殖活動の開始に及ぼす光の影響を調べるとともに、その内的転換機構を明らかにすることを目的として行われた。得られた研究成果の概要は以下の通りである。</p>		

(次頁へ続く)

審査要旨

1. ルリスズメダイの8種類の光受容体遺伝子を眼及び脳からクローニングした。そのうち、long-wavelength sensitive cone opsin (sdLWS)、VA opsin (sdVAL)、exo-rhodopsin (sdExo)、そして short-wavelength sensitive cone opsin (sdSWS1)については、完全長の Open reading frame (ORF) を決定し、それぞれ 357、425、353、そして 339 残基のアミノ酸をコードしていることを明らかにした。また、middle-wavelength sensitive cone opsin 1 (sdMWS1)、middle-wavelength sensitive cone opsin 2 (sdMWS2)、rhodopsin (sdRhod)、そして melanopsin (sdOpn4)については部分長の ORF を決定した。
2. クローニングした光受容体遺伝子のうち、sdLWS、sdVAL、sdRhod、sdExo および sdOpn4 は脳内に発現していることを確認した。In-situ hybridization により sdLWS mRNA が視床下部域の前核に発現すること、そして免疫組織化学的手法により、sdVAL 免疫陽性反応が視床下部域の外側隆起核に局在することを確認し、いくつかの機能的なオプシン様光受容体が脳内に存在することを明らかにした。
3. 赤色発光ダイオードによる長日条件下で非成熟期のルリスズメダイを飼育することにより、卵巣内に卵黄形成を誘導することに成功した。さらに、短日条件であっても Zeitgeber time (ZT)12 と ZT13 間に一時間の光を照射することによっても卵巣の発達を誘導できることを明らかにし、卵発達に関する光誘導相がルリスズメダイに存在することを明らかにした。
4. 脳内で発現する時計遺伝子のうち、sdPer1、sdPer2 および sdCry2 は光条件にかかわらず一定の発現パターンを示したが、sdCry1 は長日と短日光条件下で飼育した魚で発現パターンが異なっていることを明らかにした。sdPer1、sdPer2 および sdCry2 が光周性による影響を受けないことから、時計遺伝子の影響下にある光誘導相が常に決まった時間に出現することにより、日長の差を魚が読み取ることが出来ることを示唆した。

網膜外光受容体が繁殖活動に果たす役割は鳥類において研究されてきた。一方、魚類においては網膜外光受容体の存在を示す研究は断片的に行われているだけであり、網膜外光受容体を網羅的に調べて研究対象として、脳内における発現パターン等を明らかにした研究は、本研究が世界で初めてである。本研究で特筆すべき研究成果は、赤色オプシン (sdLWS) が脳内に発現しており、長波長帯を主たる吸収波長とする光受容体であるルリスズメダイの繁殖に重要な役割を持つことを示した点である。また、光誘導相の存在を時計遺伝子の発現との関連と議論した点は新規性が非常に高い。一連の研究は、魚類における外部環境刺激が内的シグナルに転換される機構解明とサンゴ礁環境への魚類の適応機構解明に一石を投じるものである。このような成果は、魚類をはじめとする脊椎動物の環境適応に重要な情報を時間生物学の基礎的な分野に提供するばかりでなく、人為的環境による水産生物のリズム制御を通しての水産振興に貢献するものと期待される。

学位論文の一部は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「可」に値するという結論に至った。

平成24年2月13日午前9時より、学位論文の内容に関する学力確認が理学部複合棟102教室にて行われた。最終試験としてパワーポイントを用いたコンピュータプレゼンテーションによる40分間の口頭発表と、発表内容に関する質疑応答を20分間行った。申請者は専門分野及び関連分野の質問に対して適切に回答をしていた。論文審査委員会は、琉球大学理工学研究科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」とした。