



Title	メダカに学ぶ脊椎動物の冬季適応戦略
Author(s)	中山, 友哉; Nakayama, Tomoya; 吉村, 崇 他
Description	第一章：変温動物
Citation	低温科学, 81, 61-70
Issue Date	2023-03-20
DOI	https://doi.org/10.14943/lowtemsci.81.61
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/89117
Type	departmental bulletin paper
File Information	07_p061-070_LT81.pdf



メダカに学ぶ脊椎動物の冬季適応戦略

中山 友哉¹⁾, 吉村 崇²⁾

2022 年 11 月 29 日受付, 2023 年 1 月 6 日受理

四季が存在する温帯地域では, 季節の変化に伴って大きな環境変動が起きる. 温帯に生息する動物はやがて訪れる冬季の環境を乗り越えるために, 様々な生理機能や行動を秋から冬にかけて変化させるが, その分子機構の多くは謎に包まれている. 本稿では, 季節適応の研究において優れたモデルであるメダカに対して, オミクス解析やケミカルゲノミクス, ゲノム編集などの様々なアプローチを活用することで明らかとなってきた脊椎動物の冬季適応戦略について紹介する. また, メダカで明らかとなったメカニズムについてヒトとの共通点やヒトへの応用についても議論する.

Winter adaptation strategies of vertebrates: lessons from medaka

Tomoya Nakayama¹ and Takashi Yoshimura²

In temperate climate, various ecosystem components show dynamic seasonal changes, for example, animals change their physiology and behavior from autumn to winter to cope with the oncoming winter. However, their underlying molecular mechanisms remain poorly elucidated. In this paper, we introduce winter adaptation strategies of vertebrates that have been revealed by integrating various approaches such as multi-omics analysis, chemical genomics, and genome editing to medaka fish (*Oryzias latipes*), an ideal model for studying seasonal adaptation. We also discuss similarities between medaka and humans as well as possible applications of our findings to human health.

キーワード: メダカ, 冬季適応, 色覚, 社会性, 冬季うつ病

medaka, winter adaptation, color perception, sociability, winter depression

1. はじめに

四季が存在する温帯地域では, 季節の変化に伴って 1 年を周期とした環境変動が起きる. 1 年中気温が安定している熱帯と異なり, 温帯では冬に気温が大きく下がる上, エネルギー源となる食料が乏しくなるため, 多くの動物にとって厳しい季節である. そのため, 温帯に生息

する動物は冬への適応戦略機構を進化の過程で獲得してきた. 冬眠はよく知られた冬への適応戦略の一つであるが, 冬眠をしない動物においても体内の様々な生理機能や行動が秋から冬にかけて変化することが知られている. 繁殖はエネルギーコストが高い活動の一つであり, 温帯に生息する多くの動物は特定の季節にのみ繁殖を行う. ウズラやハムスターなど孵卵期間や妊娠期間が短い

連絡先

吉村 崇

名古屋大学

〒464-8601 愛知県名古屋市千種区不老町

Tel. 052-789-4056

e-mail: takashiy@agr.nagoya-u.ac.jp

1) 名古屋大学高等研究院 (Institute for Advanced Research, Nagoya University), 名古屋大学大学院生命農学研究科動物統合生理学研究室 (Laboratory of Animal

Integrative Physiology, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

2) 名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所 (Institute of Transformative Bio-Molecules (ITbM), Nagoya University), 名古屋大学大学院生命農学研究科動物統合生理学研究室 (Laboratory of Animal Integrative Physiology, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University)

動物は、日長が長くなる春に繁殖を開始し、日長が短くなる秋に繁殖を停止する。彼らは食料が豊富な時期に仔が生まれるよう春から夏にかけて繁殖活動を行い、秋から冬にかけてエネルギー消費を抑えるため繁殖を停止する生存戦略をとる。また、回遊や渡りも特定の季節に行われる。ブリやマイワシは水温の低下を避けて秋から冬に暖かい海域に移動する。また、ハクチョウやカモなど多くの渡り鳥は食料が豊富で温暖な気候を求めて、秋に大規模な渡りをする事が知られている。このように、動物はやがて訪れる厳しい冬季の環境を乗り越えるために、様々な生理機能や行動を変化させるが、その分子機構の多くは謎に包まれている。

地球上には姿、形、能力が異なる多種多様な生き物が存在しているが、ある生命現象の仕組みを解き明かすには、数ある生物種の中からその研究に最適な種を選ぶことが重要である。モデル動物の代表とも言えるマウス (*Mus musculus*) やショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) は生物学の発展に大きく寄与してきたが、季節に対する応答性が不明瞭である。当研究室ではこれまで洗練された季節応答を示すウズラ (*Coturnix japonica*) を用いることで、春を感知して繁殖を開始する脳内情報伝達経路を明らかにしてきたが (Yoshimura et al., 2003; Nakao et al., 2008; Nakane et al., 2010)、ウズラは遺伝子操作が難しく、遺伝子改変動物の作出がルーチンワークとして行えないという限界があった。一方、メダカ (*Oryzias latipes*) は、北は青森、南は沖縄まで日本の広い範囲に生息しており、明瞭な季節応答性を示すことが知られている。また、ゲノム編集技術が確立しており、遺伝子操作が比較的容易に行える大きな利点があるため、脊椎動物の季節適応の研究において優れたモデルである。本稿では、この優れたモデルであるメダカに対してオミクス解析やケミカルゲノミクス、ゲノム編集など様々なアプローチを適用することで、明らかとなってきた脊椎動物の冬季の短日・低温環境への適応機構について紹介する。

2. 季節（低温）で変化する光感受性と色覚

繁殖はあらゆる生物において重要なイベントであり、動物たちは繁殖相手を惹きつけるために様々な工夫をする。クジャクやイワドリは、鮮やかな飾り羽や扇型のトサカを雌に見せることでアピールし、雌はこれらの装飾を指標に繁殖相手を決める。またサケやアマサギのように繁殖期に特有の体色となる婚姻色を示す動物や、カメレオンのように体色を変えながら求愛する動物もいる。

このように動物の装飾や体色は、繁殖期における視覚の重要性を示している。眼の網膜には、視覚をつかさどっている視細胞があり、桿体細胞が薄暗いところで薄明視に関わっており、錐体細胞が明るいところで色覚を担っている。ヒトの眼には、青、緑、赤の3つの色を感じる錐体視物質（オプシン）がそれぞれ一つずつある一方で、メダカの眼には紫、青、緑、赤の4つの色を感じるオプシンがそれぞれ二つずつ、合計8つも存在する。これまでの魚類を用いた研究から、これらのオプシン遺伝子の発現量は、生息地域の環境変化に応じて変化することが報告されている。例えば、トゲウオの赤オプシン (LWS (Long-wave-sensitive) オプシン, 赤感受性) の発現量は日長に応じて変化し (Sato et al., 2014)、スズメダイの赤オプシンおよび緑オプシン (RH2 (Rhodopsin 2) オプシン, 緑感受性) の発現量は水深に応じて変化することがわかっている (Stieb et al., 2016)。これらの報告から、遺伝子発現の変化により色に対する感受性が変化する可能性は指摘されていたものの、制御機構や生理学的意義については、これまで未解明のままであった。

私たちはメダカをモデルとして脊椎動物の季節適応の研究をしている中で、自然条件下において夏と冬でメダカの行動が大きく変化することに気づいた。この行動の季節変化に興味を持ち、短日・低温 (10 時間点灯, 14 時間消灯, 水温 8℃) の冬を模した条件下で飼育したメダカと、長日・温暖 (14 時間点灯, 10 時間消灯, 水温 26℃) の夏を模した条件下で飼育したメダカの行動を観察した。その結果、屋外での観察の結果と同様、夏のメダカは水槽全体を活発に動き回ったのに対して、冬のメダカは水槽の底でじっとしていることが明らかとなった (図 1a)。この行動の季節変化に興味を持ち、光に対する応答性を季節間で比較することとした。多くの魚は新規環境下で一方の側面から強い光を当てると、それから逃げるように逆側の側面を泳ぐ習性 (負の走光性) が知られている (Brockhoff et al., 1995)。そこで、この行動を指標に光に対する応答性を夏のメダカと冬のメダカで評価した。その結果、夏のメダカは、光を避ける負の走光性を示したのに対して、冬のメダカは反応しなかったため、冬のメダカは光に対する感受性が低下していることが示唆された (図 1b)。

多くの動物が繁殖期になると婚姻色を示し、異性にアピールするように、メダカも繁殖期である春から夏にかけて鱗に黒い点が現れ、体の橙色・赤色が濃くなる婚姻色を示す。季節によって光に対する応答性が異なることから、婚姻色に対する嗜好性も季節によって異なることが考えられた。そこで、この仮説を検証するために、コ

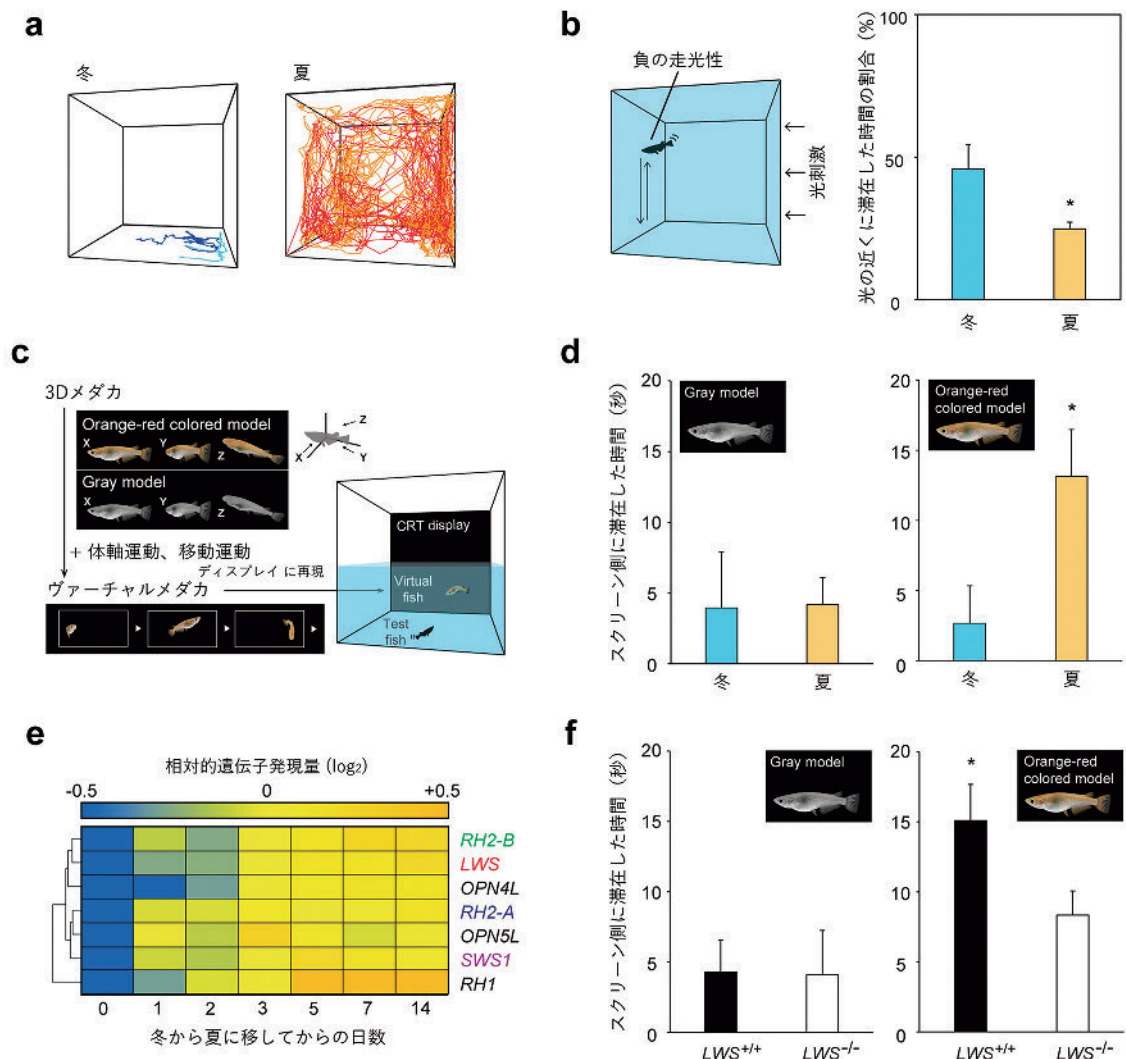


図1: (a) 冬と夏のメダカの遊泳軌跡. 社会性の強いメダカの自然な状態での行動を観察するため, 2匹を供試しており, 異なる色の軌跡はその2匹の軌跡を示している. (b) 夏のメダカと冬のメダカの光に対する反応の違い. 夏のメダカは光刺激に対して負の走光性を示すが, 冬のメダカは示さない (* $P < 0.05$). (c) ヴァーチャルメダカを用いた体色に対する嗜好性の評価. パソコン上で作製した3Dのメダカに動き (Biological motion) を追加することで, モニター上で動くヴァーチャルメダカを作製した. モニターの前に水槽を置いて, 実際のメダカを入れ, 配偶者嗜好性試験を行った. (d) ヴァーチャルメダカの体色を変えて嗜好性試験を行ったところ, 夏のメダカは婚姻色のメダカに誘引されたのに対して, 冬のメダカは誘引されなかった (* $P < 0.05$). (e) 冬の条件から夏の条件に移した際のオプシンに関連する遺伝子発現の変動. マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の結果, 冬の条件から夏の条件に移すとメダカのオプシンの発現が劇的に上昇することが明らかになった. 青色と黄色はそれぞれ遺伝子の発現が低い状態と高い状態を示す. (f) 赤オプシン欠損メダカは, 夏の条件下で, 野生型に比べて婚姻色の配偶者に対する嗜好性が低下していた (* $P < 0.05$)

ンピュータグラフィックスで作製したヴァーチャルメダカを作製し, 行動実験を実施した. メダカの求愛行動はオスがメスに対して行うため, メスのヴァーチャルメダカをディスプレイに映し出し, ヴァーチャルメダカの体色を変えることで, 婚姻色に対するオスのメダカの嗜好性を検討した (図1c). ヴァーチャルメダカを用いることで, メダカが分泌する化学信号 (フェロモン等) が嗜好性に関与している可能性を排除することができ, またヴァーチャルメダカの動きを完全に同じものに行うことができるため, 個体ごとに異なる行動パターンが嗜好性

に影響している可能性を排除することができる. これによりメダカの体色に対する嗜好性のみを評価することができる. まず, 白黒のヴァーチャルメダカを提示したところ, 冬のメダカも夏のメダカも, ヴァーチャルメダカに誘引される度合い (ディスプレイの近くに滞在した時間) は共に少ないことがわかった. 続いて, 婚姻色のヴァーチャルメダカを提示したところ, 冬のメダカは誘引されなかった一方で, 夏のメダカは婚姻色のヴァーチャルメダカに強く誘引された (図1d). 以上のことから, メダカは冬と夏では光感受性や色覚が異なることが

明らかとなった。

次に光感受性や色覚の季節変化の分子メカニズムを明らかにするために、冬の環境から夏の条件に移行した際のメダカの眼の時系列試料を用いた網羅的な遺伝子発現解析を実施した。その結果、視覚をつかさどるオプシンやオプシンの下流の光情報伝達経路の遺伝子の発現が、冬では著しく低下していたのに対して、夏の条件に移すと急激に上昇することが明らかになった (図 1e)。この中には、ロドプシンである *RH1*、赤色光感受性オプシンである *LWS*、緑色光感受性オプシンである *RH2-B*、青色光感受性オプシンである *RH2-A*、紫外線感受性オプシンである *SWS1* が含まれていた。前述の通り、メダカは繁殖期になると体の橙色や赤色が濃くなる婚姻色を示す。そこで、これらのオプシンの発現が夏に上昇する生理学的意義を検討するため、橙色や赤色の感受に重要な *LWS* に着目して、さらなる検証を進めた。

まず、*in situ* hybridization 法を用いて、赤色光感受性オプシン遺伝子 (*LWS*) の眼における遺伝子発現を時空間的に解析したところ、光を感知している網膜の視細胞層において遺伝子発現が確認され、またその発現量は冬のメダカよりも夏のメダカで高かった。さらに、CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集技術により、*LWS* を欠損し、赤色光を感知することができないメダカを作成して、光に対する応答性や婚姻色の配偶者に対する嗜好性を評価した。その結果、*LWS* 欠損メダカでは、負の走光性と、婚姻色ヴァーチャルメダカに対する嗜好性が、野生型の *LWS* を欠損していないメダカに比べて低下していることが明らかになった (図 1f)。最後に、オプシン遺伝子の発現を制御する因子を検討したところ、水温の上昇が引き金となってオプシン遺伝子の発現が誘導されることがわかった。以上の結果から、メダカは水温の季節変化に応じて、光感受性や色覚がダイナミックに変化していることが明らかになった (Shimmura et al., 2017)。

冬は、夏に比べ日照時間が短く、また水温も低いことから、仔魚や稚魚の成育には適さない。そのため、メダカは秋になると繁殖行動を停止させ、冬には食料をほとんど摂取せず、川底に留まって活動量を低下させる。この間、食料を探したり、婚姻色により交配相手を見分けたりする必要がなくなるため、オプシン遺伝子の発現を抑えることは理にかなっている。また遺伝子発現を抑えることでタンパク質生産のエネルギーコストを抑制することは、重要な適応的意義があると考えられる。一方、春から夏にかけて日照時間が長くなり、水温が上昇すると、オスのクジャクが尾羽を伸ばしてメスを惹きつける

のと同様に、メダカは婚姻色を発達させることで異性を惹きつける。この婚姻色を見分けるために、繁殖期に眼の光感受性や色覚を顕著に発達させ、それにより繁殖の成功率をあげているのは興味深い適応進化である。

3. 季節で変化する社会性

ヒトの季節性感情障害 (seasonal affective disorder : SAD) は特定の季節にのみ、抑うつ症状などの気分の変調が現れる精神疾患で、冬に現れることが多いため「冬季うつ病 (winter depression)」とも呼ばれる。冬季うつ病の主な症状には倦怠感や不安感の増加、活力や社会性・性欲の低下、体内時計の乱れ (概日リズム障害)、過眠や過食などがあげられる (Rosenthal et al., 1984; Wirz-Justice, 2018)。これらは季節繁殖や冬眠などの動物の季節応答の表現型と類似点が多いため、冬季うつ病は季節繁殖や冬眠の名残だと古くから指摘されてきた。また、冬にうつ様の行動が引き起こされることは様々な動物においても観察されており、このような行動変化は冬の厳しい環境を乗り切る適応戦略と考えられている。しかし、冬季うつ病の発症機序や冬のうつ様行動の分子メカニズムは明らかとなっていなかった。

メダカは「メダカの学校」と言われるように群れを作って行動する社会性の高い動物である。前述したように、メダカにおいても行動が季節によって大きく変化するため、社会性や不安様行動が季節によって変化することが考えられた。そこで、メダカにおいてうつ様行動が季節によって変化するかを検討するため、夏の長日・温暖条件 (14 時間点灯, 10 時間消灯, 水温 26℃) と冬の短日・低温条件 (10 時間点灯, 14 時間消灯, 水温 8℃) で飼育したメダカを用意し、社会性や不安の度合いを評価できる行動実験を実施した。見慣れない新奇な水槽に入れた魚はしばらく水槽の底で身を潜めるが、この時間が長いと不安が強いと解釈される (新奇水槽試験)。冬の条件で飼育されたメダカは夏の条件で飼育されたメダカに比べて、水槽の底での滞在時間が長くなることがわかった。また、明るいエリアと暗いエリアを設けた水槽に入れたときは、不安が強いと外敵に見つかりにくい暗いエリアに滞在することが知られている (明暗水槽試験)。そこで明暗水槽試験を実施したところ、冬条件のメダカは夏条件よりも暗いエリアの滞在時間が長く、新奇水槽試験と同様に不安が強いと評価された。三部屋式社会性試験は動物の社会性を評価する行動試験である。透明な仕切りで三部屋に区切られた水槽の中央の部屋に観察対象の個体を入れ、残りの部屋の一方にだけ他個体

を入れる。すると中央の部屋の観察個体は他個体の入った部屋の近くのエリア (preferential area) に滞在する「社会性行動」が観察される。しかし、冬条件のメダカは preferential area での滞在時間が夏条件に比べて短かった (図 2a)。これらの行動実験から、メダカは冬の環境下では社会性が低下していることが明らかになった。

冬における不安感の増加や社会性の低下はヒトの冬季うつ病の特徴である (Rosenthal et al., 1984; Wirz-Justice, 2018)。うつ病はストレスを含めた厳しい環境を乗り切る適応機構であることを考えると、メダカで観察された冬季の社会性の低下や不安様行動などの表現型からメダカが冬季うつ病のモデルとなり得ると考えた。また、うつ病は複雑な多因子疾患であり、後述するように様々な仮説が提案されているが理解が進んでいない。そのため既存の知見に基づく仮説駆動型のアプローチ (hypothesis-driven approach) には限界があり、発見駆動型のアプローチ (discovery-driven approach) が有効であると考えられた。そこで仕組みの全容を理解するためにマルチオミクスの網羅的な解析を行うことにした。まずメタボローム解析で脳の代謝物の季節変化を検討した。冬条件と夏条件にそれぞれ暴露したメダカの脳を用いてキャピラリー電気泳動-飛行時間型質量分析 (CE-TOFMS) によるメタボローム解析を実施し、水溶性イオン代謝物の季節変化を調べた。その結果、ヒトのうつ病と関連が指摘されているセロトニンやグルタミン酸などの神経伝達物質や抗酸化物質のグルタチオンなど、68 個の代謝物がメダカの脳で変化していることが明らかになった。選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) が抗うつ作用を示すことから、セロトニンはうつ病に寄与していると考えられてきた (セロトニン仮説) (Andrews et al., 2015)。メダカの脳においてはセロトニンの量が季節によって変化しており、冬に増加していることが明らかとなった。また、NMDA 型グルタミン酸受容体に作用するケタミンは即効性のある抗うつ薬として注目されている。メダカの脳においてはグルタミン酸の量は冬に増加していた。さらに近年、酸化ストレスとうつ病の関係が指摘されているが (Yang et al., 2018)、抗酸化物質であるグルタチオンは冬に減少していることが明らかとなった。このように、ヒトのうつ病に関与する複数の代謝物が冬と夏のメダカの脳で変動することが明らかになったことから、改めてメダカは冬季うつ病のモデルとして妥当であると考えられた。

次に脳における遺伝子発現の季節変化を網羅的に調べるためにトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、3,000 個以上の転写産物量が夏と冬の間で変化する

ことが明らかになった。冬季うつ病の症状の一つに約 24 時間のリズムを刻む概日リズムの障害が知られており、これが冬季うつ病の一因と考えられてきた (概日リズム仮説) (Rosenthal et al., 1984; Wirz-Justice, 2018)。睡眠・覚醒、体温、ホルモン分泌など、細胞レベルから個体レベルまで、様々な生理機能に概日リズムが認められるが、この概日リズムは「時計遺伝子」と総称される一連の遺伝子の転写翻訳フィードバックループによって制御されている (Takahashi, 2017) (金らの原稿参照)。ヒトの冬季うつ病患者の遺伝解析で、時計遺伝子の *PER*, *CRY*, *BMAL1*, *CLOCK* などに多型が見つかっており、時計遺伝子と冬季うつ病の関連が指摘されていた (Garbazza & Benedetti, 2018)。メダカのトランスクリプトーム解析の結果、冬条件のメダカでは、時計遺伝子の発現リズムが不明瞭になっており、冬季うつ病患者同様、概日リズムが冬季に乱れていることが示唆された。次に発現変動していた遺伝子群についてカノニカルパスウェイ解析を実施して、夏と冬で活性が変化する情報伝達経路を探索したところ、うつ病との関連が広く知られているグルココルチコイド受容体シグナル伝達経路やエストロゲン受容体シグナル伝達経路を見出した。ストレスを受けると視床下部-下垂体-副腎 (hypothalamus-pituitary-adrenal: HPA) 軸が活性化し、グルココルチコイドの分泌が亢進するが、HPA 軸の異常はうつ病を含めた様々な精神疾患との関連が報告されている (Pariente & Lightman, 2008)。また閉経後の女性だけでなく、男性においてもエストロゲンが抗うつ作用を持つことが知られている (Xu et al., 2017)。さらにこれらの情報伝達経路のほかにも、炎症反応を担うインターロイキンに関連する遺伝子群や、炎症の原因となる酸化ストレスに関連する NRF2 抗酸化経路の活性が冬と夏の間で変わることが明らかになった。この結果はメタボローム解析で検出した抗酸化物質のグルタチオン量の季節変化の結果とも一致する。近年、炎症反応はアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患だけでなく、うつ病を含めた精神疾患の病態や発症に関与することが指摘されている (うつ病炎症仮説) (Mille & Raison, 2016; Wohleb et al., 2016)。炎症性サイトカイン刺激は活性酸素種の増加を介して神経細胞の障害を誘導すると考えられている。この神経細胞障害によって神経細胞の樹状突起スパインの密度が減少する (Mille & Raison, 2016)。樹状突起スパインはシナプス後部の棘状構造であり、シナプス後電位や活動電位の発生に関与する。うつ病患者においては海馬の樹状突起スパインの密度の低下が報告されているが、冬型のメダカにおいても海馬相

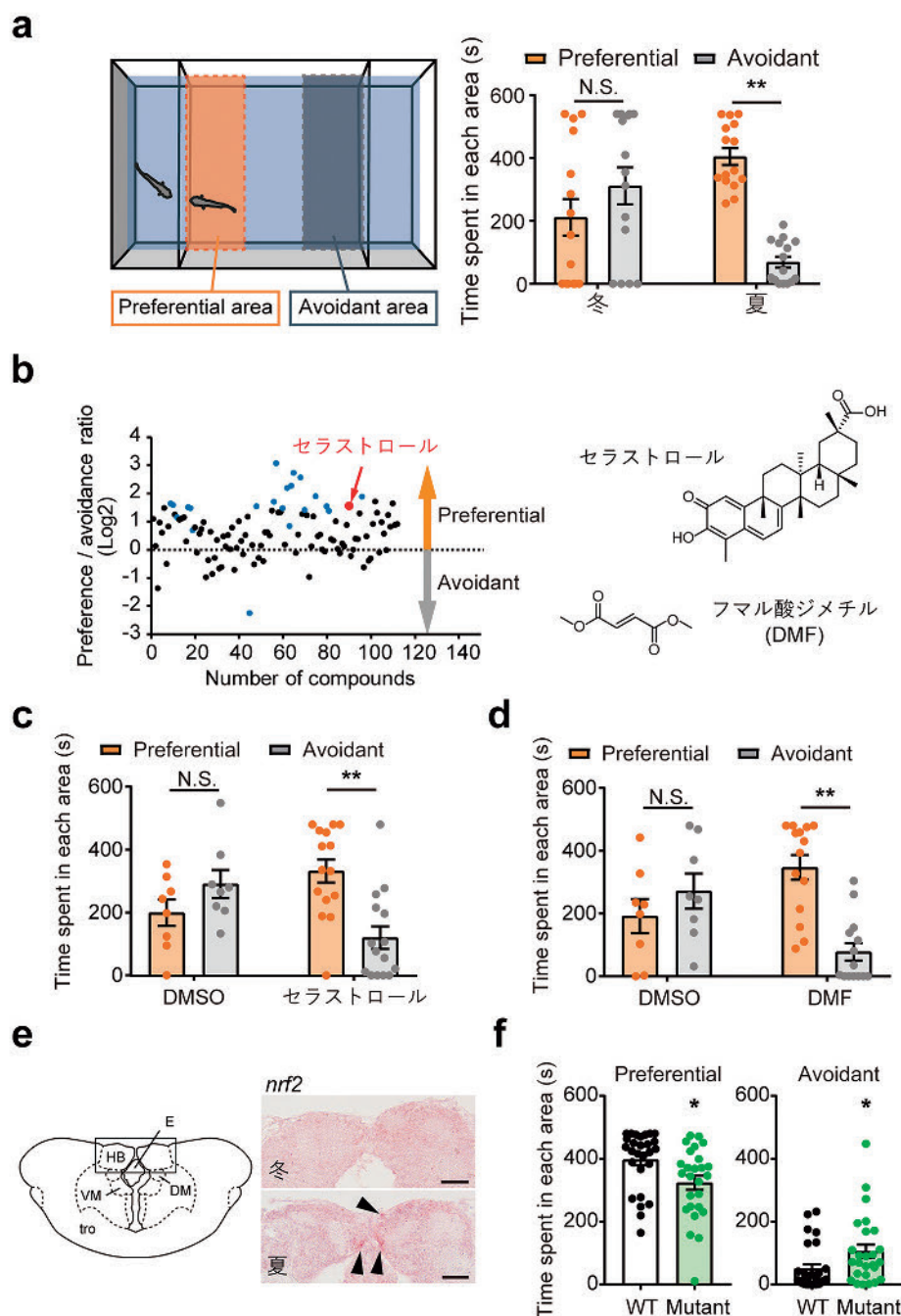


図2: (a) 三部屋式社会性試験の模式図。夏の条件で飼育したメダカはより多くの時間を他個体の近くの Preferential area で過ごしたが、冬の条件で飼育したメダカは他の魚に興味を示さなかった (two-way ANOVA and Sidak's multiple comparison test. $**P < 0.01$, N.S. 有意差なし, 平均 $\pm$ SEM, $n = 15$)。 (b) 112種類の既存薬スクリーニングの結果。セラストロールは、1回目、2回目、3回目のスクリーニングを通過した唯一の薬物であった。Y軸はPreference areaとAvoidance areaでの滞在時間のlog2比を示す。 (c) セラストロールを投与したメダカの三部屋式社会性試験の結果。セラストロール投与によって、Preferential areaに滞在する時間が有意に長くなった (two-way ANOVA and Sidak's multiple comparison test. $**P < 0.01$, N.S. 有意差なし, 平均 $\pm$ SEM, $n = 8-15$)。 (d) DMFを投与したメダカの三部屋式社会性試験の結果。DMFの投与によって、Preferential areaに滞在する時間が有意に長くなった (two-way ANOVA and Sidak's multiple comparison test. $**P < 0.01$, N.S. 有意差なし, 平均 $\pm$ SEM, $n = 8-14$)。 (e) 手綱核における*nrf2*の発現部位。黒矢尻は*nrf2*のシグナルを示す (スケールバーは50 μ m)。HB: 手綱核; E: 松果体; DM: 終脳背側野内側部, VM: 視床腹内側核; tro: 視索。 (f) *nrf2*変異体における三部屋式社会性試験の結果。*nrf2*変異体はPreferential areaに滞在する時間が有意に短くなった ($*P < 0.05$, 平均 $\pm$ SEM, $n = 26-27$)。

同領域の樹状突起スパイン密度が低くなることが確認された。

メタボローム解析とトランスクリプトーム解析を通じて、夏条件と冬条件のメダカの脳の間に様々な違いが明らかとなり、ヒトのうつ病との共通点が多数あぶりだされたが、その中のどれが決定的な役割を果たしているかはわからなかった。そこで化合物スクリーニングによって重要な因子を絞り込むことにした。ただし、表現型スクリーニングでヒット化合物が見つかったとしても、化合物のターゲット同定は容易ではない。一般的には細胞ベースアッセイであってもターゲット同定は容易ではないので、動物個体を用いた表現型スクリーニングにターゲット未知の化合物を用いることは無謀と思われた。そのため、この研究ではターゲットが既知で、安全性も確認されている既存薬ライブラリーを用いた既存薬再開発 (drug repositioning) のアプローチを採用することにした。冬の環境で飼育したメダカの水槽に既存薬を投薬し、24 時間後に三部屋式社会性試験を使って、冬季の社会性の低下を改善する既存薬を探索した。生化学実験とは異なり、動物の行動実験は結果がばらつきやすく、再現性を確認することが極めて重要なので、二人の実験者が独立して実験を実施し、どちらが実施しても再現性を確認できる化合物を探索した (図 2b)。その結果、大変幸運なことに、百数十個の既存薬の中から再現性良く社会性を改善するセラストロールを見出すことに成功した (図 2b, c)。セラストロールは中国伝統医薬「雷公藤」の成分の五環トリテルペノイドで、抗がん作用や抗肥満作用、抗炎症作用などが知られていたが、中枢神経系への効果は知られていなかった。文献を調べてみると、セラストロールには様々な標的タンパク質があることがわかったが、そのうちの一つにカノニカルパスウェイ解析で見出していた NRF2 (NF-E2-related factor 2) があった (Seo et al., 2011)。活性酸素種の刺激を受けた細胞では NRF2 が活性化し、タンパク質修復や抗酸化物質産生に関わる遺伝子群の転写を促進することで酸化ストレスを減らし、炎症を抑える。NRF2 に制御される抗酸化物質の一つにグルタチオンがあるが、本研究のメタボローム解析で見出したグルタチオンが夏に高いという結果とも一致していた。炎症はうつ病発症の一因と指摘されているが、*Nrf2* 欠損マウスがうつ様行動を示すことが報告されていることも注目値する (Martin-de-Saavedra et al., 2013)。

前述したように多くの化合物は類似した様々なタンパク質に作用するため、仮説の検証実験が不可欠である。セラストロールも例外ではなく多数のターゲットを持つ

ことが知られているため、まずセラストロールとは化学構造の異なる NRF2 アクチベーターのフマル酸ジメチル (DMF) においても冬季の社会性を改善できることを確認した (図 2d)。また、*in situ* hybridization 法により、*nrf2* の発現部位を調べたところ、*nrf2* はうつ病の発症に重要な役割を果たす手綱核 (habenula) で発現していることをわかった (図 2e)。さらに CRISPR/Cas9 法で *nrf2* 遺伝子の変異メダカを作出し、三部屋式社会性行動テストを実施した結果、*nrf2* 遺伝子変異メダカは野生型に比べて preferential area における滞在時間が短くなることがわかった。以上の結果から、冬条件のメダカにおける NRF2 抗酸化経路の活性の低下が冬季うつ様行動を惹起すること、さらにセラストロールが NRF2 抗酸化経路を活性化することで冬季うつ様行動を改善していることが示唆された (図 2f) (Nakayama et al., 2020)。

ゼブラフィッシュやメダカなどの小型魚類は脊椎動物であり、マウスと比べて安価で小さく、動物個体を用いた表現型スクリーニング (phenotypic screening) においてもスループットが良い大きなメリットがある。また、神経伝達物質やその受容体、さらにはそれらを標的とした薬剤の効果においてヒトとの高い相同性が認められる。そのため、近年欧米のメガファーマにおいてもゼブラフィッシュが精神疾患のモデル動物として利用されているが、メダカはあまり用いられてこなかった。今回、明瞭な季節応答を示すメダカをモデルとしてケミカルゲノミクスのアプローチを適用することで、メダカの冬季うつ様行動の制御に NRF2 抗酸化経路が関わっていることを明らかにすることができた。外部環境が厳しい時はあまり動き回らず、じっとして厳しい時期をやり過ごした方が良いので、メダカの冬季のうつ様行動は厳しい環境を乗り切る適応戦略と言える。同様に、ヒトの冬季うつ病や大うつ病 (major depression) も厳冬の屋外の自然環境や、激しいストレスを回避する適応機構と考えることができる。SAD の症状は秋から冬にかけて現れ、春から夏にかけて消失するのが一般的である。冬から春への季節的な環境変化は SAD の究極の治療法であり、これはメダカにおいても同様である。現在広く用いられているうつ病の動物モデルは、SAD の症状である自発的かつ反復性の気分障害は示さない。SAD 患者と冬に近い環境で飼育されたメダカの表現型の類似性を考えると、メダカをモデルとした研究による発見は季節的に調節される感情障害の理解と治療に役立つことが期待される。

4. ヒトとの共通点とヒトへの応用

自身の生活環を自然環境に身を任せている動物と異なり、私たち人間は照明や空調を用いることで、光や温度など本来季節によって変化する環境因子を人工的に制御し、1年中快適な環境で生活することができる。また、季節に関わらず、いつでも野菜や果物、魚を食べることができるようになったため、現代の生活から季節感が薄らいでいるが、実は我々ヒトの気分や免疫機能・代謝などの生理機能も季節の影響を受けて変化する。また、感染症や心疾患・肺がんなどの病気の発症率にも季節の偏りがあり、多くが冬季に重症化することも知られている (Stevenson et al., 2015)。今回紹介した冬季うつ病もその一つである。冬季うつ病をもたらす主要な環境要因は、秋から冬における日長や日照時間の減少だと考えられている (Rosenthal et al., 1984)。実際、日長の変化が小さい低緯度地域においては冬季うつ病の発症率は1%以下であるが、欧米などの高緯度地域における罹患率は人口の約10%だと推算されている。日本においても、冬の日照時間が短い東北地方や日本海側の地域では冬季うつ病の発症率が高い。また、冬季うつ病の治療には冬の日照時間の減少を人工的に補う「高照度光療法」が有効とされている (Rosenthal et al., 1984)。しかし、高照度光療法はまぶしい光源の前に長時間拘束される上に、頭痛や焦燥感を覚えるなどの副作用があるほか、中断すると抑うつ症状が再発する可能性が高いことが危惧されている。一方、汎用される抗うつ薬の選択的セロトニン再取り込み阻害薬 (SSRI) の冬季うつ病への有効性も疑問視されている。そのため、冬季うつ病の発症機序の解明と、高照度光療法に代わる新たな治療薬の開発が期待されている。

1つ目に紹介した研究では、メダカの光感受性や色覚が季節によって変化していることを明らかにした。また、これらの季節変化が眼におけるオプシン遺伝子のダイナミックな発現変動によってもたらされていることも明らかにすることができた。興味深いことに色覚の季節変化はヒトにおいても報告されている (Jordan & Mollon, 1993; Welbourne et al., 2015)。また、SAD患者は健常者と比べて冬に網膜の光感受性が低下しており、夏または高照度光療法によって網膜の光感受性が回復する。これらの事実は、ヒトにおいても網膜の光感受性や色覚が季節によって変化することを示唆しているが、その分子メカニズムは明らかではなかった。そこで、メダカで明らかとなったメカニズムが哺乳類においても共通しているかを検討したところ、マウスにおいてもメダカと同様、

網膜の光感受性が季節によって変化することが明らかとなった (Okimura et al., 2021)。一方、メダカと異なり、マウスではオプシン遺伝子の発現は季節変動しておらず、日長によって制御されているドーパミンシグナル伝達経路を介して網膜の光感受性が季節変動していることが明らかとなった。メダカのオプシン遺伝子の発現は水温によって制御されていた。一方、マウスのドーパミンシグナル伝達経路は温度ではなく、日長によって制御されていた。マウスの網膜の光感受性が日長による影響を受けることは、前述したヒトのSAD患者の事例とも共通しており、今後網膜のドーパミンシグナル伝達経路を標的とする薬剤を開発することによって、SADの治療または予防のための別の治療標的を提供する可能性が期待される。

2つ目に紹介した研究では、メダカをモデルとすることで、冬のうつ様行動に抗酸化経路であるNRF2抗酸化経路が重要であることを明らかにした。また、ケミカルゲノミクスのアプローチからメダカの冬季うつ様行動を改善させる薬であるセラストロールを発見することができた。セラストロールは現在、炎症性疾患や癌の治療に使用されており、NF κ Bや熱ショックタンパク質90など複数の分子標的を持っている (Kannaiyan et al., 2011)。さらに、セラストロールはNRF2抗酸化経路を活性化することで抗炎症作用を発揮する (Seo et al., 2011; Divya et al., 2016)。メダカにおいては、構造的に異なるNRF2活性化物質であるDMFも冬のうつ様行動を改善させ、CRISPR/Cas9によって作製した*nrf2*変異体は社会性が低下していた。同様に、*Nrf2*欠損マウスがうつ病様行動を示すことや、うつ病モデルマウスにおいてNRF2アゴニストによる治療が抗うつ効果を示すことが報告されている (Martín-de-Saavedra et al., 2013)。さらに、*nrf2*は夏の条件において手綱核で発現していた。手綱核は魚類から哺乳類まで保存されている神経核であり、抗うつ薬のケタミンの作用部位という報告もあることから、うつ病への関与が指摘されている。これらの事実から、NRF2は冬季うつ病の新たな治療標的になる可能性があることを示唆しており、この研究をもとにメダカがヒトの冬季うつ病の理解と創薬に貢献することが期待される。

参考文献

Andrews, P. W., Bharwani, A., Lee, K. R., Fox, M., & Thomson, J. A. (2015). Is serotonin an upper or a downer? The evolution of the serotonergic system and its role in

- depression and the antidepressant response. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 51, 164–188. <https://doi.org/10.1016/J.NEUBIOREV.2015.01.018>
- Brockerhoff, S. E., Hurley, J. B., Janssen-Bienhold, U., Neuhauss, S. C. F., Driever, W., & Dowling, J. E. (1995). A behavioral screen for isolating zebrafish mutants with visual system defects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92 (23), 10545–10549. <https://doi.org/10.1073/PNAS.92.23.10545>
- Divya, T., Dineshbabu, V., Soumyakrishnan, S., Sureshkumar, A., & Sudhandiran, G. (2016). Celastrol enhances Nrf2 mediated antioxidant enzymes and exhibits anti-fibrotic effect through regulation of collagen production against bleomycin-induced pulmonary fibrosis. *Chemico-Biological Interactions*, 246, 52–62. <https://doi.org/10.1016/J.CBI.2016.01.006>
- Garbaza, C., & Benedetti, F. (2018). Genetic factors affecting seasonality, mood, and the circadian clock. *Frontiers in Endocrinology*, 9 (AUG), 481. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2018.00481/BIBTEX>
- Jordan, G., & Mollon, J. D. (1993). The Nagel anomaloscope and seasonal variation of colour vision. *Nature* 363: 6429, 363(6429), 546–549. <https://doi.org/10.1038/363546a0>
- Kannaiyan, R., Shanmugam, M. K., & Sethi, G. (2011). Molecular targets of celastrol derived from Thunder of God Vine: Potential role in the treatment of inflammatory disorders and cancer. *Cancer Letters*, 303(1), 9–20. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2010.10.025>
- Lavoie, M.-P., Lam, R. W., Bouchard, G., Sasseville, A., Charron, M.-C., Gagné, A.-M., Tremblay, P., Filteau, M.-J., & Hébert, M. (2009). Evidence of a biological effect of light therapy on the retina of patients with seasonal affective disorder. *Biological Psychiatry*, 66(3), 253–258. <https://doi.org/10.1016/J.BIOPSYCH.2008.11.020>
- Martín-de-Saavedra, M. D., Budni, J., Cunha, M. P., Gómez-Rangel, V., Lorrio, S., del Barrio, L., Lastres-Becker, I., Parada, E., Tordera, R. M., Rodrigues, A. L. S., Cuadrado, A., & López, M. G. (2013). Nrf2 participates in depressive disorders through an anti-inflammatory mechanism. *Psychoneuroendocrinology*, 38(10), 2010–2022. <https://doi.org/10.1016/J.PSYNEUEN.2013.03.020>
- Miller, A. H., & Raison, C. L. (2016). The role of inflammation in depression: from evolutionary imperative to modern treatment target. *Nature Reviews Immunology*, 16(1), 22–34. <https://doi.org/10.1038/nri.2015.5>
- Nakane, Y., Ikegami, K., Ono, H., Yamamoto, N., Yoshida, S., Hirunagi, K., Ebihara, S., Kubo, Y., & Yoshimura, T. (2010). A mammalian neural tissue opsin (Opsin 5) is a deep brain photoreceptor in birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107 (34), 15264–15268. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006393107>
- Nakao, N., Ono, H., Yamamura, T., Anraku, T., Takagi, T., Higashi, K., Yasuo, S., Katou, Y., Kageyama, S., Uno, Y., Kasukawa, T., Iigo, M., Sharp, P. J., Iwasawa, A., Suzuki, Y., Sugano, S., Niimi, T., Mizutani, M., Namikawa, T., Ebihara, S., Ueda, H. R., & Yoshimura, T. (2008). Thyrotrophin in the pars tuberalis triggers photoperiodic response. *Nature*, 452 (7185), 317–322. <https://doi.org/10.1038/nature06738>
- Nakayama, T., Okimura, K., Shen, J., Guh, Y.-J., Tamai, T. K., Shimada, A., Minou, S., Okushi, Y., Shimmura, T., Furukawa, Y., Kadofusa, N., Sato, A., Nishimura, T., Tanaka, M., Nakayama, K., Shiina, N., Yamamoto, N., Loudon, A. S., Nishiwaki-Ohkawa, T., Shinomiya, A., Nabeshima, T., Nakane, Y., & Yoshimura, T. (2020). Seasonal changes in NRF2 antioxidant pathway regulates winter depression-like behavior. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 202000278. <https://doi.org/10.1073/pnas.2000278117>
- Okimura, K., Nakane, Y., Nishiwaki-Ohkawa, T., & Yoshimura, T. (2021). Photoperiodic regulation of dopamine signaling regulates seasonal changes in retinal photosensitivity in mice. *Scientific Reports* 2021 11: 1, 11(1), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81540-w>
- Pariente, C. M., & Lightman, S. L. (2008). The HPA axis in major depression: classical theories and new developments. *Trends in Neurosciences*, 31(9), 464–468. <https://doi.org/10.1016/J.TINS.2008.06.006>
- Rosenthal, N. E., Sack, D. A., Gillin, J. C., Lewy, A. J., Goodwin, F. K., Davenport, Y., Mueller, P. S., Newsome, D. A., & Wehr, T. A. (1984). Seasonal affective disorder. *Archives of General Psychiatry*, 41(1), 72–80. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.1984.01790120076010>
- Seo, W. Y., Goh, A. R., Ju, S. M., Song, H. Y., Kwon, D.-J., Jun, J.-G., Kim, B. C., Choi, S. Y., & Park, J. (2011). Celastrol induces expression of heme oxygenase-1 through ROS/Nrf2/ARE signaling in the HaCaT cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 407 (3), 535–540. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2011.03.053>
- Shao, Y. T., Wang, F. Y., Fu, W. C., Yan, H. Y., Anraku, K., Chen, I. S., & Borg, B. (2014). Androgens increase *lws* opsin expression and red sensitivity in male three-spined sticklebacks. *PLOS ONE*, 9(6), e100330. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0100330>
- Shimmura, T., Nakayama, T., Shinomiya, A., Fukamachi, S., Yasugi, M., Watanabe, E., Shimo, T., Senga, T., Nishimura, T., Tanaka, M., Kamei, Y., Naruse, K., & Yoshimura, T. (2017). Dynamic plasticity in phototransduction regulates seasonal changes in color perception. *Nature Communications*, 8 (1), 412. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00432-8>
- Stevenson, T. J., Visser, M. E., Arnold, W., Barrett, P., Biello, S., Dawson, A., Denlinger, D. L., Dominoni, D., Ebling, F. J., Elton, S., Evans, N., Ferguson, H. M., Foster, R. G., Hau, M., Haydon, D. T., Hazlerigg, D. G., Heideman, P., Hopcraft, J. G. C., Jonsson, N. N., Kronfeld-Schor, N., Kumar, V., Lincoln, G.

- A., MacLeod, R., Martin S. A. M., Martinez-Bakker, M., Nelson, R. J., Reed, T., Robinson, J. E., Rock, D., Schwartz, W. J., Steffan-Dewenter, I., Tauber, E., Thackeray, S. J., Umstätter, C., Yoshimura, T., & Helm, B. (2015). Disrupted seasonal biology impacts health, food security and ecosystems. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282(1817). <https://doi.org/10.1098/RSPB.2015.1453>
- Stieb, S. M., Carleton, K. L., Cortesi, F., Marshall, N. J., & Salzburger, W. (2016). Depth-dependent plasticity in opsin gene expression varies between damselfish (Pomacentridae) species. *Molecular Ecology*, 25(15), 3645–3661. <https://doi.org/10.1111/MEC.13712>
- Takahashi, J. S. (2016). Transcriptional architecture of the mammalian circadian clock. *Nature Reviews Genetics* 2016 18: 3, 18(3), 164–179. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.150>
- Welbourne, L. E., Morland, A. B., & Wade, A. R. (2015). Human colour perception changes between seasons. *Current Biology*, 25(15), R646–R647. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2015.06.030>
- Wirz-Justice, A. (2018). Seasonality in affective disorders. *General and Comparative Endocrinology*, 258, 244–249. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2017.07.010>
- Wohleb, E. S., Franklin, T., Iwata, M., & Duman, R. S. (2016). Integrating neuroimmune systems in the neurobiology of depression. *Nature Reviews Neuroscience*, 17(8), 497–511. <https://doi.org/10.1038/nrn.2016.69>
- Xu, Y., Ma, L., Jiang, W., Li, Y., Wang, G., & Li, R. (2017). Study of sex differences in duloxetine efficacy for depression in transgenic mouse models. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 11, 344. <https://doi.org/10.3389/fncel.2017.00344>
- Yang, Y., Cui, Y., Sang, K., Dong, Y., Ni, Z., Ma, S., & Hu, H. (2018). Ketamine blocks bursting in the lateral habenula to rapidly relieve depression. *Nature*, 554 (7692), 317–322. <https://doi.org/10.1038/nature25509>
- Yoshimura, T., Yasuo, S., Watanabe, M., Iigo, M., Yamamura, T., Hirunagi, K., & Ebihara, S. (2003). Light-induced hormone conversion of T4 to T3 regulates photoperiodic response of gonads in birds. *Nature*, 426(6963), 178–181. <https://doi.org/10.1038/nature02117>