

Nara Women's University

有尾両生類の概日行動リズムの季節変化と繁殖サイクル

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 長井清香 公開日: 2012-06-04 キーワード (Ja): アカハライモリ, ニューロステロイド, 行動リズム, 体内時計, 有尾両生類 キーワード (En): 作成者: 長井, 清香 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10935/3101

有尾両生類の概日行動リズムの
季節変化と繁殖サイクル

博士論文

2000年

奈良女子大学人間文化研究科生活環境学専攻

長井清香

①

目次

1. 序論

2. 有尾両生類下での行動リズムの概観

2-1 概論

2-2 材料と方法

2-3 結果

2-4 考察

3. 有尾両生類リズムに對する環境的考察

3-1 概論

3-2 材料と方法

3-3 結果

3-4 考察

4. 有尾両生類リズムの環境的考察

4-1 概論

4-2 材料と方法

4-3 結果

4-4 考察

5. 有尾両生類リズムとそこから得られる知見

5-1 概論

5-2 材料と方法

5-3 結果

5-4 考察

6. 結論

7. 参考文献

8. 謝辞

9. 略称

10. 索引

2000年博士論文

「有尾両生類の概日行動リズムの
季節変化と繁殖サイクル」

長井 清香

奈良女子大学
人間文化研究科生活環境学専攻

目次

1. 序論	1
2. 準自然条件下での行動リズムの解析	4
2-1 序論	
2-2 材料と方法	
2-3 結果	
2-4 考察	
3. 概日行動リズムに関与する環境要因の解析	18
3-1 序論	
3-2 材料と方法	
3-3 結果	
3-4 考察	
4. ニューロステロイドと繁殖サイクル	38
4-1 序論	
4-2 材料と方法	
4-3 結果	
4-4 考察	
5. 光受容系とそこからの神経連絡	51
5-1 序論	
5-2 材料と方法	
5-3 結果	
5-4 考察	
6. 総論	69
7. 文献	73
8. 要旨	84
9. 概要	86
10. 謝辞	87

1. 序論

生物は体内に生物時計と呼ばれる時間測定機構を保持し、環境の周期的変化に適応しているとされている。体内時計を持つことで、活動期には血糖値や体温、心拍数の増加 (Halberg 1980, Reinberg 1978)、生理活性物質の濃度、エネルギー供給力などを高め、厳しい環境での生存能力を高める。また、渡り鳥などに見られるように、太陽の位置で方向を知り、体内時計を利用して、時間を知っていることによる (Kramer 1950)。このように、外界からの刺激に反応するのみではなく、自身が時間機構を装備することによって、環境の変化を予想して、外的因子の影響を最小限に抑えて恒常性を維持したり、地球の自転が生み出す周期的な環境の変化に適応した生理的变化を生んでいるとされる。また、認知機構とも関連しており、自らの生存に適した行動を、体内時計を通じて、調節していると考えられる。

脊椎動物の日周期性や年周期性などの時間生物学分野で、哺乳類、鳥類における研究は多いが、魚類、両生類、爬虫類を含めた系統進化的視点からの研究はほとんどなされていない。両生類は水陸両生で、系統進化的にも、水中生活から陸上生活に移行する重要な位置にある。中でも有尾両生類は、原始的で成体になっても水中で生活するため、魚類との比較において、適当な動物であると考えられる。アカハライモリは、日本において広範かつ一般的に生息している有尾両生類であり、このような研究に最適であると考えた。

脊椎動物では、生物時計の中核が、脳・神経系にあるとされる。哺乳類では視床下部の視交叉上核 (SCN) に中核があること (Rusak and Zucker 1979, Lehman 1987, Inouye and Kawamura 1982, 本間 他 1989) がわかっており、時計発振の分子機構の解析がすすんでいる。時計機構は、単一の細胞にも存在し、SCNのほとんどの細胞が、*mPer1-2* (Shearman et al. 1997)、*mPer3* (Takumi et al. 1998)、*BMAL1* (Honma et al. 1998)、*Clock* (King et al. 1997)、*Tim* (Zylka et al. 1998) の4種の時計遺伝子を発現している。このような時計遺伝子は、脳の他の細胞や全身の組織にも存在しており、振動しているが、SCNを中核として、神経および液性因子により、統一的に振動していると考えられている (岡村、重吉 1999)。鳥類以下では眼、松果体、脳深部の3器官からなるマルチオシレーターを、構成している (大石 1999)。両生類においては、アフリカツメカエルの概日時計が、眼とSCNから構成されていることが報告されている (Harada et al. 1998)。哺乳類以外の脊椎動物の多くは、複数の振動体からなるマルチオシレーターが統一的に機能することにより、適応的な周期的運動を繰り返している。それは、振動体同士のカップリングや、環境の周期的な刺激により、時計が一斉に

リセットされることによる。イモリについても、マルチオシレーターシステムを持つと予想されているが (Chiba et al. 1993)、その意義は興味深い。今回、個体レベルで解析をすすめることで、幾つかの可能性を提示できたと考えている。有尾両生類の脳・神経系に関する研究は少なく、光受容系および概日振動体間の解析、および出力系への経路などの解明が待たれている。

有尾両生類についての生態調査の仕事 (Hayashi 1989, Naruse 1993, Naruse and Oishi 1996) は少なく、イモリの日周期活動についても、詳細は知られていない。従って、自然の気象条件で、観察しやすく、環境をできるだけ単純化しノイズを減らした準自然条件下で、約1年半にわたりイモリの日周期活動を記録した。そして、記録された日周期の季節変化について、(1)室内での行動リズム記録から、行動リズムと環境の関係を検討、(2)ニューロステロイドや生殖腺の成熟といった内因性の検討、(3)組織化学的検討の、3つのアプローチから解析に取り組んだ。

環境との関係について調べた仕事のほとんどは、光との関係を論じたものである。それは、生物時計は、環境周期に同調する性質を持つが、光は生物時計の強力な同調因子であるからである。

光は、哺乳類のSCNで、MAPキナーゼの活性を介して、CREBのリン酸化を惹起し、時計を同調させる (Obrietan 1998, 井上 1999)。これは、神経連絡を介して、グルタミン酸により時計細胞のNMDA受容体やAMPA受容体を活性化させることによる

(Schurov 1999)。そして、鳥類の松果体で観察されているような光受容細胞からのメラトニン分泌量のリズムの位相シフトが起こること (深田 and 真野 1999) で、様々な行動や生理のリズムに影響を与える。

変温動物は、温度に影響されやすいことから、高等脊椎動物とは異なるコントロールを受けていると思われる。トカゲは、松果体が、温熱トランジェューサーとして機能しているとされる (Underwood 1990)。時計は温度補償性があるとされるので、温度の影響は時計に直接作用するのではなく、二次的に行動リズムに反映されている可能性が考えられる。また、両生類には、活動に最適照度があるとされる (Jaeger and Hailman 1973)。光にはパラメトリックな作用とノンパラメトリックな作用があるが、BMALは、光のパラメトリックな作用に関与していると考えられている (本間 1999)。

光に対する反応は、温度によって変化し、また同じ条件で与えた光刺激でも、照度によって変化する (Underwood and Calaban 1987)。照度 (Tokura and Aschoff 1978, Erkert and Thiemann 1982, Hang and Augelika 1983) や温度 (Tokura and Aschoff 1983, Irving et al. 1993) の変化によって、恒温動物のフリーランニング周期は変化する。夜行性か昼行性かによって、フリーランニング周期の変化の仕方に一定の傾向

が観られる (Aschoff 1979)。しかしながら、温度と光の相互関係に焦点をしぼってなされた仕事は、ほとんどない。マルチオシレーターを構成する眼、松果体、脳深部が、それぞれ光や温度によって異なる反応を示すなら、各生理や行動リズムへも、どれとカップリングしているかによって異なる影響が観られるはずだと考えられる。実際の個体が照度や温度によって、どのような行動リズムを形成するか、あるいはそのメカニズムの解明には、多角的なアプローチと個体レベルでの解析を必要とする。今回、日周期活動と環境との関わりを、詳細に解析するために、種々の行動リズムに対する光と温度の同調因子としての相互関係を比較した。

行動発現や環境の影響の仕方には、季節性がある。実験条件下で飼育されていたイモリの婚姻色が繁殖期に発現したり (unpublished)、環境の影響をあまり受けずに、生殖腺の成熟がすすむ時期があることが知られている (Goldman and Darrow 1983)。また、同じ環境刺激が、時期によって異なる反応を誘導する (Follett 1978)。よって、内因性の変化についても検討する必要性があることから、両生類で繁殖に関与すると予想されている脳内ニューロステロイド (Takase et al. 1999) に着目し、分析した。ニューロステロイドの量に光のどのような影響があるか、またその影響が観られるとすれば、どの光受容器官と関連があるか、破壊実験により調べた。光と生殖行動の発現の関係を、ニューロステロイドを通じて説明することで、繁殖サイクルに加え、繁殖期における概日リズムの変化についても、要因の一つを説明できると考えた。

さらに以上の実験から得られた結果をふまえて、組織化学的検討を試みた。多くの脊椎動物で脳深部光受容体が確認されているが (Yoshikawa and Oishi 1998)、有尾両生類に関しては、存在が予想されているのみであった (Chiba et al. 1993)。未だ未明であるイモリの脳深部の光受容部を免疫染色により特定した後、各光受容器官からの神経連絡を観察した。そこからの神経投射を観ることで、「光受容体-振動体」システム間に直接の連絡は無いのか、あるいはどのような連絡があるかを調べた。また、ニューロステロイド合成細胞や内分泌系の中核との神経性の連絡が無いのか検討した。

2 準自然条件下での行動リズムの解析

2-1. 序論

哺乳類ハタネズミ (Rowsemitt et al. 1982, Matuoka and Masuda unpublished) での概日リズムの季節変化の誘因として、日長が重要であると考えられている。ハタネズミ *Microtus agrestis* の日周期活動パターンは、冬から夏にかけて昼夜逆転し、春と秋には朝と夕方にピークを持つ双峰性のパターンを示した (Erkinaro 1961)。他種のハタネズミ *Microtus montanus* は夏と冬の間で日周期活動パターンが逆転し、実験室では日長条件のみがこの活動シフトを引き起こした (Rowsemitt et al. 1982)。Masuda の観察によれば、ハタネズミ *Microtus montebelli* の昼夜行性の逆転は、室内で日長の影響が観られなかったことから、温度に誘因されると考察している (personal communication)。

メダカで、昼夜逆転する季節変化が観察されることについて、水温との関連で述べられている (Yokota and Oishi 1985)。Gulf Killifish の日周期の季節変動も水温との関連で説明されている (Meier 1984)。Lake chabu のフリーランニング周期も季節で変動し (Kavaliers 1979)、この場合、季節変化は日長に引き起こされると考えられている (Kavaliers and Ross 1980)。遊泳活動と時計のカップリングが弱く (Ueda and Oishi 1982)、概日リズムが環境因子に影響されやすいと考えられている (大石 1991)。

両生類の日周期活動は野外、準自然条件下、実験条件下で記録され、報告されてきた。しかしながら、脊椎動物のなかで、両生類の詳細な研究報告は極端に少ない。野外では、高緯度地域に生息するイモリ (*Triturus vulgaris* と *T. cristatus*) について、主に薄明薄暮に活発に活動するが、その幼体は昼行性を示すことが報告されている (Dolmen 1983 a,b)。プールで自然状態におかれているヨーロッパ産イモリ smooth newt の日周期活動は、照度と温度によって影響される bimodal な活動リズムのパターンを示し、それは性別、種、季節の違いに依存して変化する (Griffith 1985)。日本産イモリ *Cynopus pyrrhogaster* は、野外で夜行性の傾向を示した (Naruse 1993, Naruse and Oishi 1996)。林の観察によれば、日本産イモリは繁殖期を除いて夜行性を示し、生殖活動、摂食活動は一日中見られ、上陸活動は晴れた日より雨天の方が多く見られた (personal communication)。しかしイモリの日周期的活動に関する詳細な記録はまだ報告されておらず、また、複数の行動内容ごとにリズムを同時記録し、それぞれに対する環境要因の影響を解析した報告は無い。

私は野外での連続観察は難しいため、校舎のベランダに設置した水槽内という準自然条

件下で日本産イモリ *Cynops pyrrhogaster* の活動リズムを、フォトトランジスターシステムにより記録する一方、詳細な日周期的活動パターンを解析するために、その行動内容を観察した。準自然条件下での観察は、環境が単純で解析しやすく、またリズムミクな活動を観察記録しやすい利点を持つ。

本章では、準自然条件において、種々の行動の日周リズムを年間を通して調べることに、行動リズムと環境因子の変動の相関から関与する因子の推定を行い、イモリの概日時計システムの適応的意義を考察した。また、行動発現とそれを誘導する因子を解析することにより、概日時計システムのメカニズムの探索を助けることができると考えている。

2-2. 材料と方法

<材料と飼育>

業者（浜松生物教材株式会社、静岡）から購入した成体日本産アカハライモリ *Cynops pyrrhogaster* 30個体からランダムに雌雄各3個体計6個体（体長:9.5-12.3 cm）を選び、南向き2階ベランダに設置したガラス製水槽（59.0L×27.0W×35.5H cm）で約一ヵ月飼育した後、1995年4月から1996年10月まで約1.7年間その活動を記録した。ガラス製水槽には、砂を敷き詰め、岩を積み上げて陸をつくった。餌は同社から購入したイトミミズをランダムに投入して常に餌がある状態をつくった。

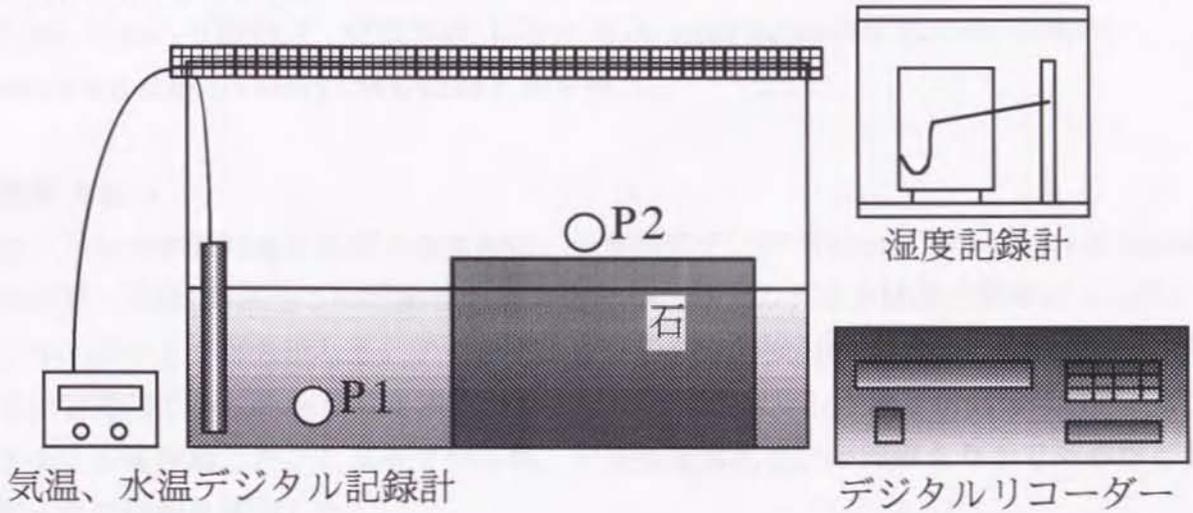
<活動の記録>

フォトセル（PHOTO MASTER PL-3: HOKUYO Automatic）を2カ所設けて、活動を記録した（Fig. 1）。陸のすぐ上と、水中の底から約2.0cmの位置に、赤外線を通し、一時間ごとにその遮断回数の総計をデジタルデータリコーダー（DDR-5310: SANYO Electronic）で記録した。

フォトトランジスターで記録すると同時に、約一ヵ月ごとに24時間を通じて目視観察を行い、上陸、生殖、呼吸の3種類の活動についてその回数を数えた。1時間ごとにはじめの15分間観察し、その活動数をカウントした。夜間の観察は、赤色光を用いた。上陸活動は陸上に静止した個体数を表わし、個体識別は行わなかった。生殖活動は異性に対するディスプレイの回数を数えた。雌に連れ添い鼻先を雌の総排出口に押し付けるなど、ディスプレイの初期の行動も回数に入れた。また雌が拒否した場合など、同一カップルの新たなディスプレイも、回数に加えている。呼吸活動は、呼吸をしに水面上に鼻孔および口を出す行動を数えた。

<環境の記録>

a) 構内の2階ベランダ



b) 恒温室内

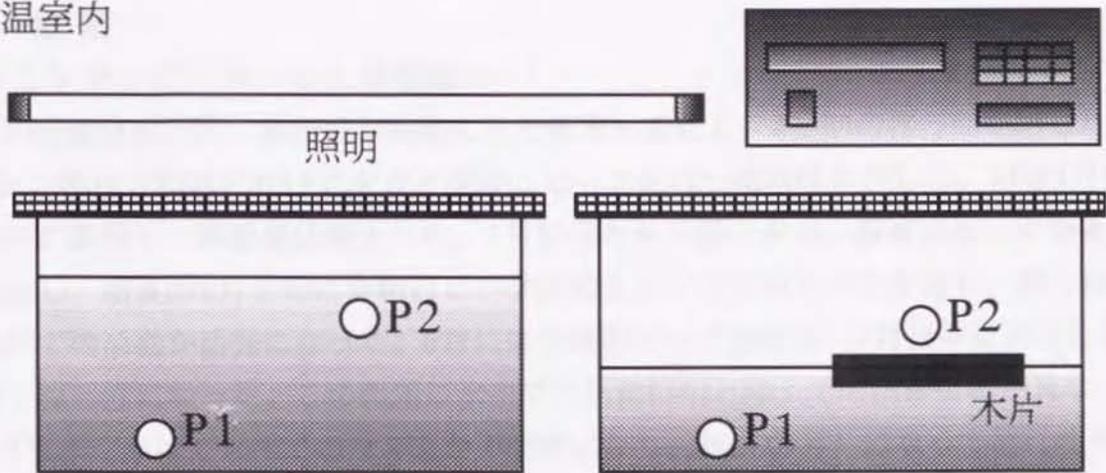


Fig. 1 行動リズムの記録方法。a) 準自然条件下での記録。b) 実験条件下での記録。P：フォトトランジスターの赤外線的位置。同時に2箇所を記録した。

自動温度記録計 (Thermo Recorder RT-10: Espec) で水温と気温を、自記湿度記録計 (Sato Keiryoki MFG.) により、水槽外の湿度を自動記録した。

観察を行ったとき、観察のはじめに、水槽内の湿度と照度を、湿度測定器 (ISUZU Digital: Isuzu Seisakusho) と照度測定器 (Topcon IM-2P: Topcon) により測定した。

日の出、日の入り時刻は、理科年表 (Choronological Scientific Tables: Tokyo Astronomical Observatory: Maruzen) から得た。

<解析方法>

概日リズムの季節的变化を調べるために、一年間のデータをevent recorder actogram (水中のデータは1時間当りの活動量の最大値を70、陸上のデータは最大値を20とした) をダブルプロットで打ち出した。アクトグラムでの視覚的検討の後、代表的なパターンを示している期間のうちの10日間を抜き出して、10日間のカウント数を時間毎に合計してヒストグラムを作成した。ヒストグラムは、平均値を算出し、平均値より上であるかどうかでピークの位相を決定した。

統計的計算は、StatView J-4.5 (Abacus concepts, Inc.) を用いて、t-testにより平均値の差を、Kendallの方法により環境因子やその他の活動との相関を見た。また、生殖腺の解析には、一標本の分散分析(ANOVA)を用いた。

2-3. 結果

<フォトトランジスターによる記録>

水中での活動は昼行性、夜行性が時期により頻繁に変化し、約6回の移行期を示した (Fig. 2)。冬から初春にかけて夕方と深夜にピークを持つ夜行性を示した。初春3月中旬に昼行性に移行し、活動量は増加した。5月初旬から早朝、夕方、深夜にピークをもつ夜行性を示し、初夏の5月下旬に早朝のピークが消失して夕方のピークを持ち、朝方から深夜にかけての活動が活発になった。6月には午後のピークを持ち、7月後半に夕方にピークを持つ夜行性になった。この時期に水中での活動位相と陸上での活動位相が異なっていた。8月後半にかけて水中でのリズムが不明確になり、秋 (10月) になって昼行性を示すようになった。冬にかけて、午後から深夜にかけての活動が活発となり、夜行性になった。冬は上陸活動は見られず、初春3月上旬に活動が見られるようになり、3月中旬には昼行性を示した。

水中での昼行性と夜行性の変わり目にあたる時期は、3月中旬、4月中旬、5月中旬、7月上旬、8月中旬、11月である。6月中旬、9月は逆転ではなく、活動位相の変化する移行期と考えられる。3月中旬はリズムが不明確となり、ほぼarrhythmicなパターンを示し、徐々に次の位相時間帯におさまってくるという形で、いわゆる再同調の形をとっているか

に見える。

ほぼ1年半（1995年4月～1996年10月）を通じて、陸上での活動は薄明薄暮に活発になり、基本的に夜行性を示した（Fig. 3）。3月に昼行性を示し、2回の活動位相の移行期があった。

一日の総活動量の年変化はほぼ温度に比例し、冬は少なく夏は多かった。春（3月下旬）と秋（10月上旬）に水中で昼行性を示すとき、水中での活動は減少し、陸上での活動が増加した。両方の活動が多いのは初夏（6月）で、さらに温度が上がる8月から9月にかけては、水中での活動は多いままであるが、陸上では減少した。

<目視観察による記録>

視覚的検討により、上陸活動は冬を除いて、主に夜間の低照度、高湿度のとき観察された（Fig. 4）。Kendallの方法により、照度と逆相関、湿度と順相関が観られた（ $p < 0.01$ ）（Fig. 7）。夏に近づくにつれ活動量は増加したが、真夏の高水温下（最低水温 $> 25^{\circ}\text{C}$ ）と冬の低水温下（最高水温 $< 10^{\circ}\text{C}$ ）では減少した。上陸活動は通年、同時に観察記録した生殖活動や呼吸活動、摂食活動といった他の活動との相関は見られなかった。水温が 10°C 以下および 25°C 以上のとき、活動の総数は有意な減少を示し、フォトランジスターの結果と一致していた。

生殖活動は、春かの4月～5月にかけて盛んに観察された。特に5月に最も多く観察された。10月から11月、1月から2月までの年間を通じ、春、秋、冬の3回観察された（Fig. 5）。全ての季節において、日周期的活動パターンに一つあるいは二つのピークを持ち、主に早朝に活発に観察され、場合によっては夕方にも再び観られた。

呼吸活動は、水温に順相関を示し（Fig. 7）、高水温の夕方に活発になる傾向が見られた（Fig. 6）。しかし冬を除いて、全ての季節にわたって最も低い水温であるにも関わらず、早朝に小さなピークが見られた。照度との相関はほとんど認められず、他の活動との相関も見られなかった。

2-4. 考察

イモリは準自然条件下で水中の活動が冬の間、あるいは春、春と夏の間、夏、秋と冬の間で活動期間が逆転する季節変化を示した（Fig. 2）。冬眠は観察されなかったが、その理由として、水槽内では餌がコンスタントにあるということ、気温の影響を受けやすく水温が上昇しやすいということ、冬眠に適した場所が存在しなかったということが考えられる。

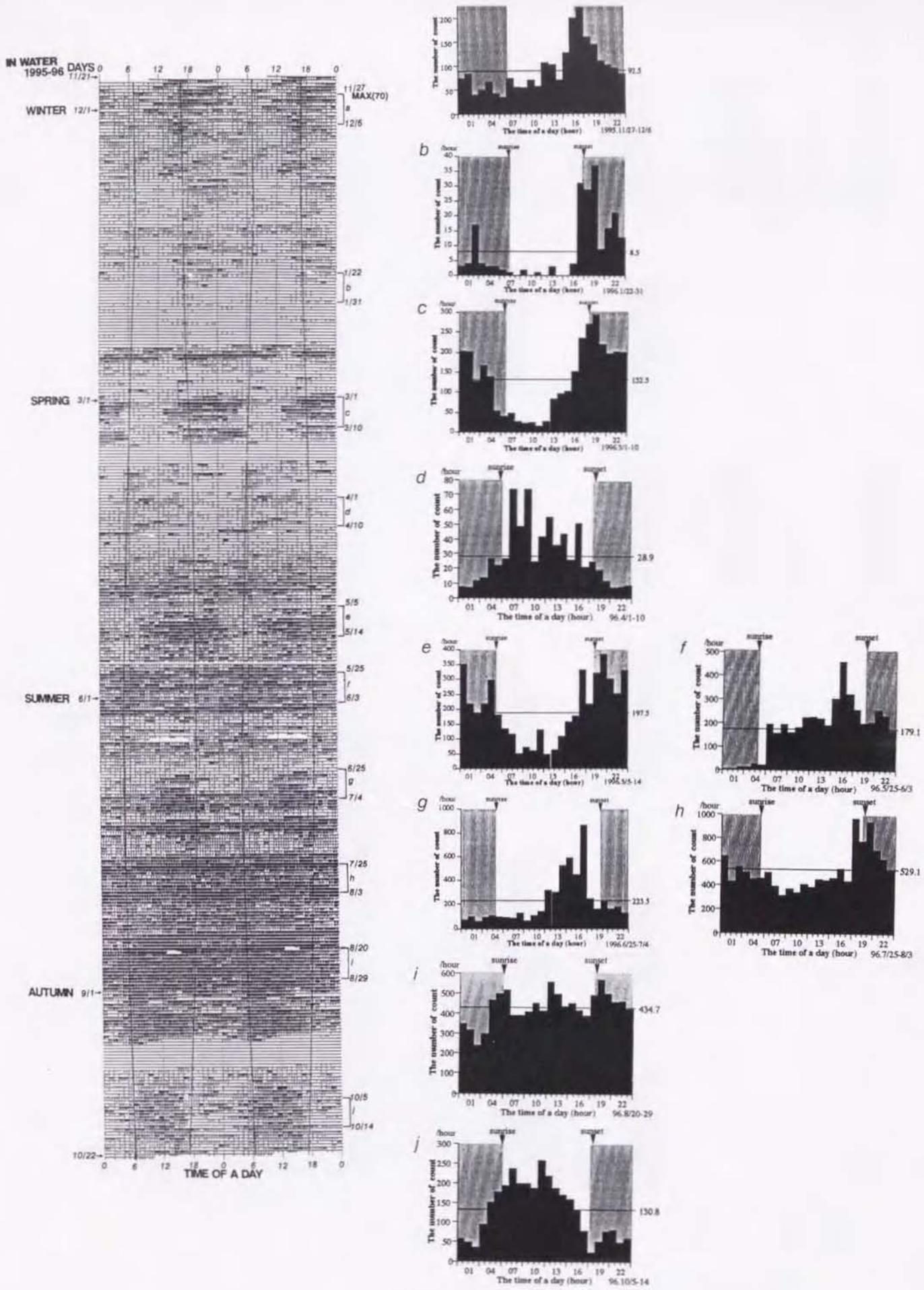


Fig. 2 準自然条件下でのフォトトランジスターによる水中での結果。左図は最大値を70にしてダブルプロットで作成したアクトグラム。図中のラインは日の出日の入り時刻を表わしている。右図は代表的な日周期を示している期間のうちの10日間を1時間ごとに合計して作成したヒストグラム。横線は一日の平均カウント数である。イベントのアルファベットとグラフのは対応している。イベントにおける3月中旬と9月中旬の空白期間はフォトトランジスターの故障による。それ以外の数時間の空白は停電および回収時によるものである。

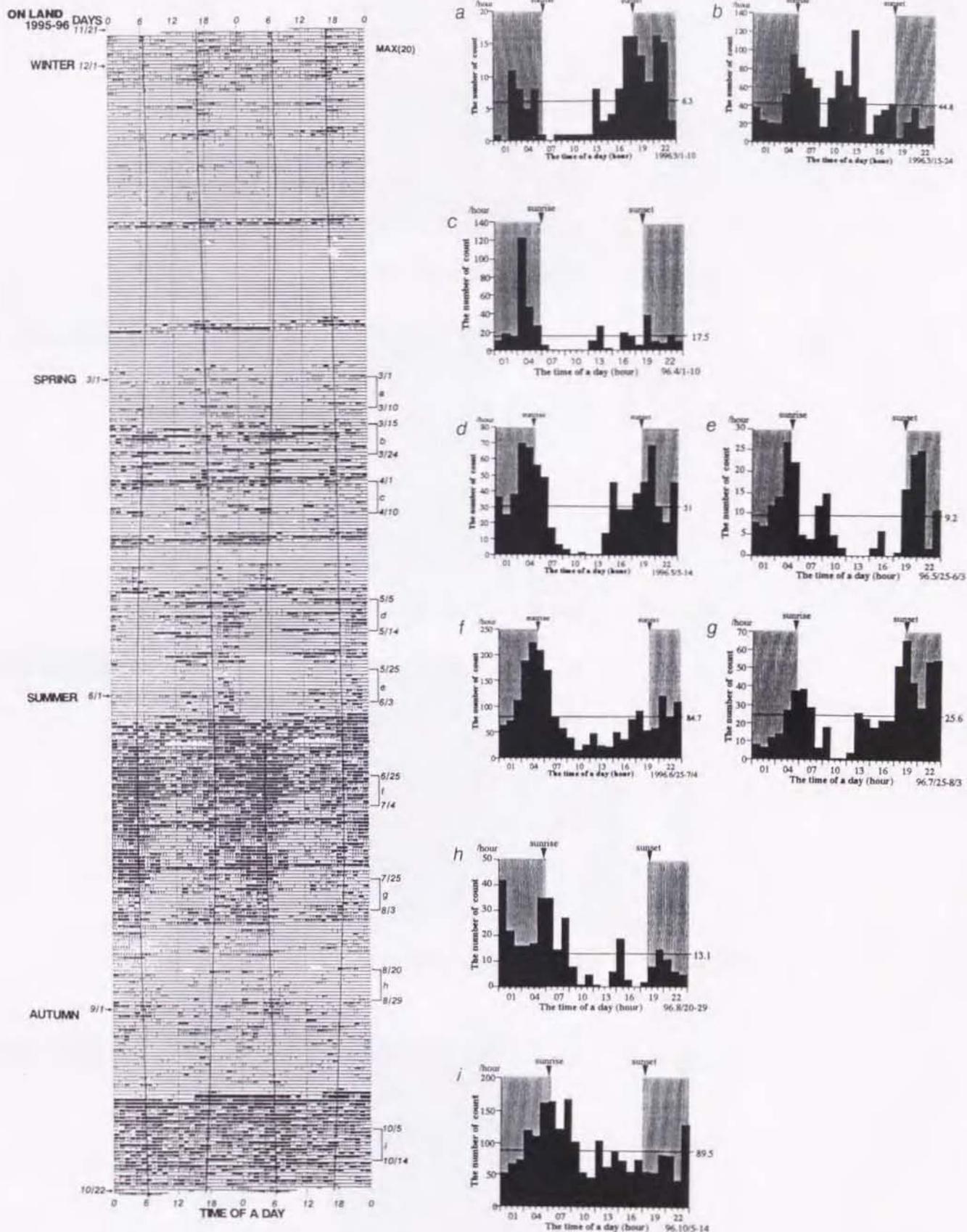
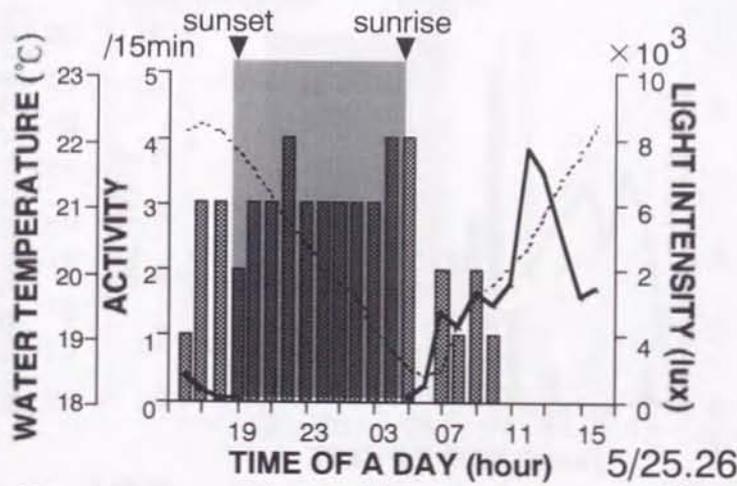
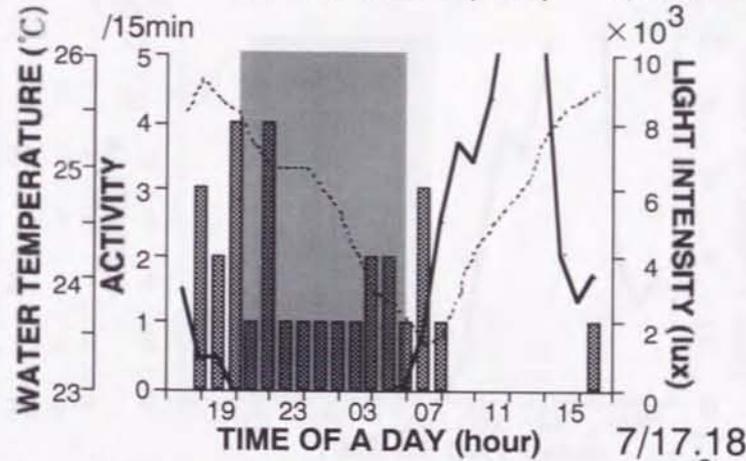


Fig. 3 準自然条件下でのフォトトランジスターによる陸上での結果。左図は最大値を20にしてダブルプロットで作成したアクトグラム。図中のラインは日の出日の入り時刻を表わしている。右図は代表的な日周期を示している期間のうちの10日間を1時間ごとに合計して作成したヒストグラム。横線は一日の平均カウント数である。イベントのアルファベットとグラフのは対応している。イベントにおける3月中旬と9月中旬の空白期間はフォトトランジスターの故障による。それ以外の数時間の空白は停電および回収時によるものである。

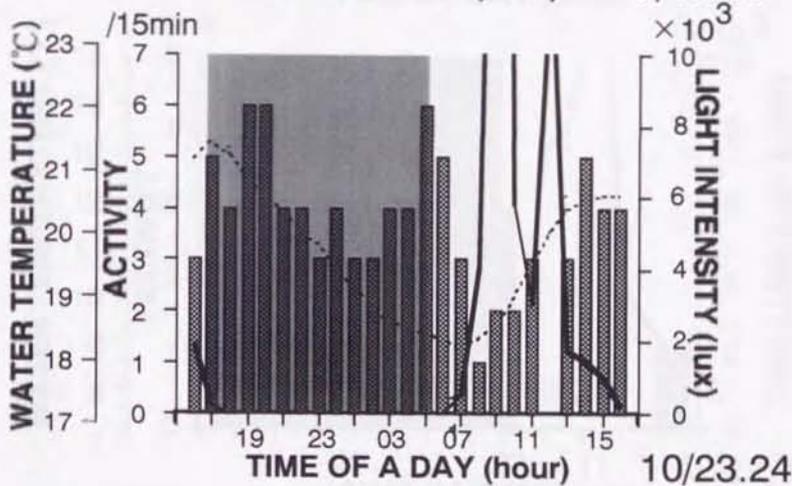
SPRING



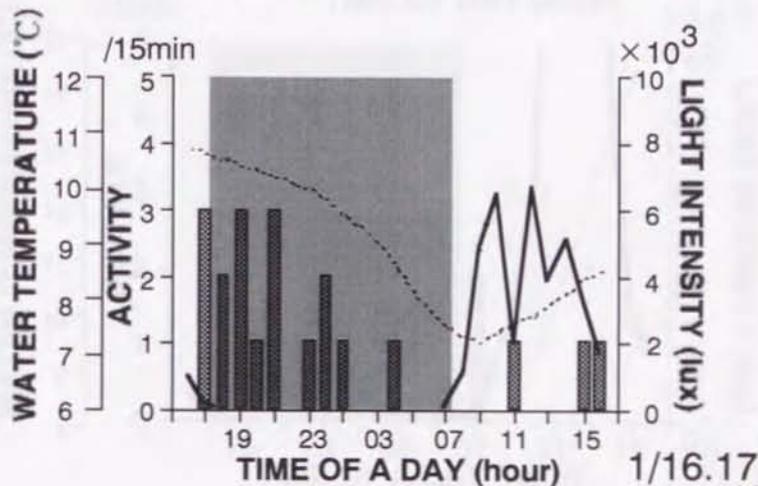
SUMMER



AUTUMN



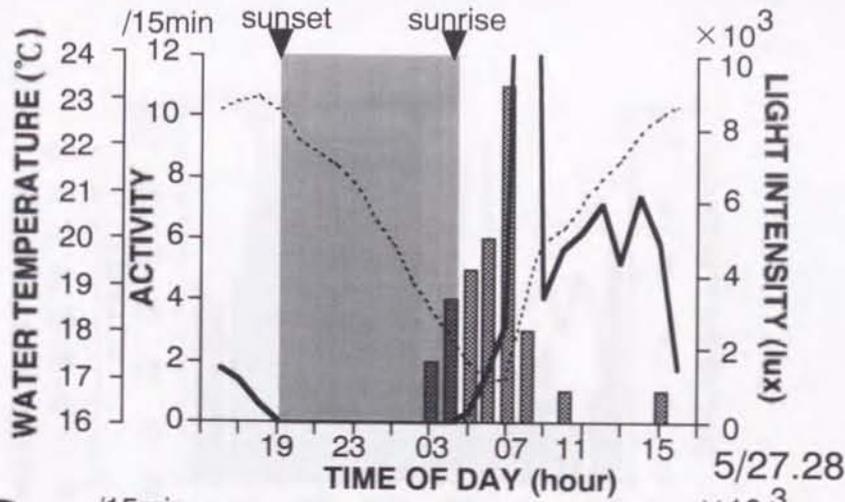
WINTER



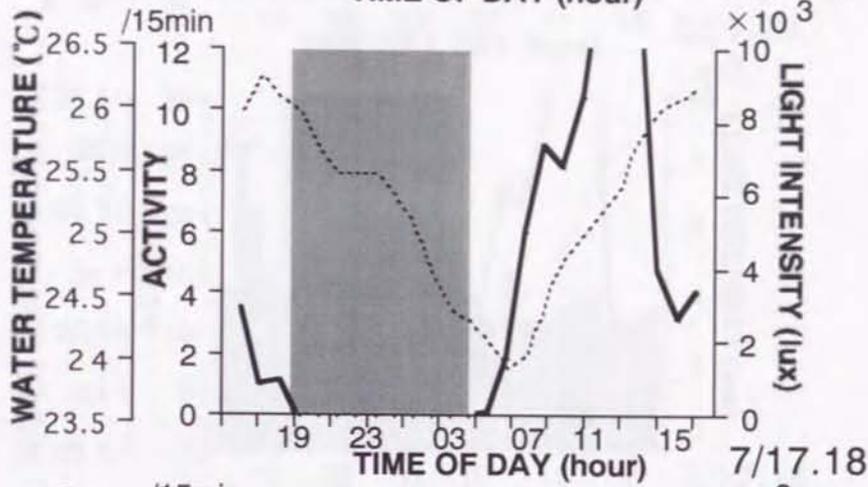
----- Water temperature
 ————— Light intensity

Fig. 4 The results of Landing Activity by observation. The number of individuals on land.

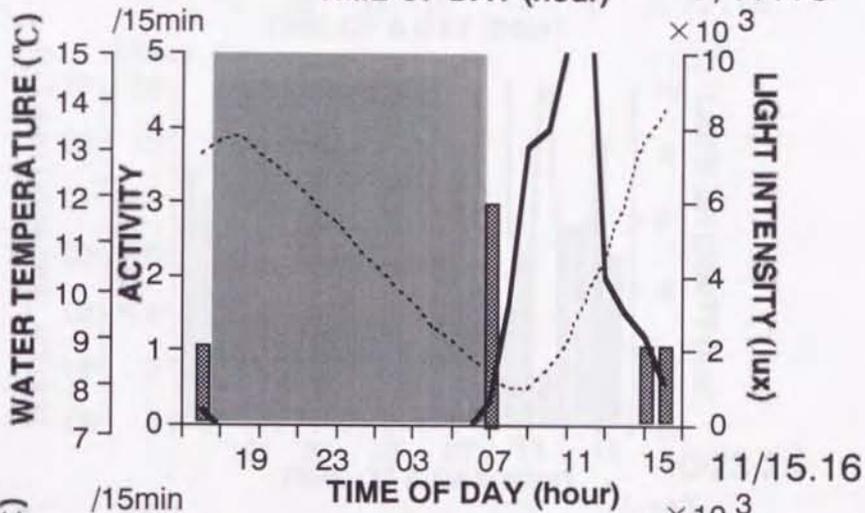
SPRING



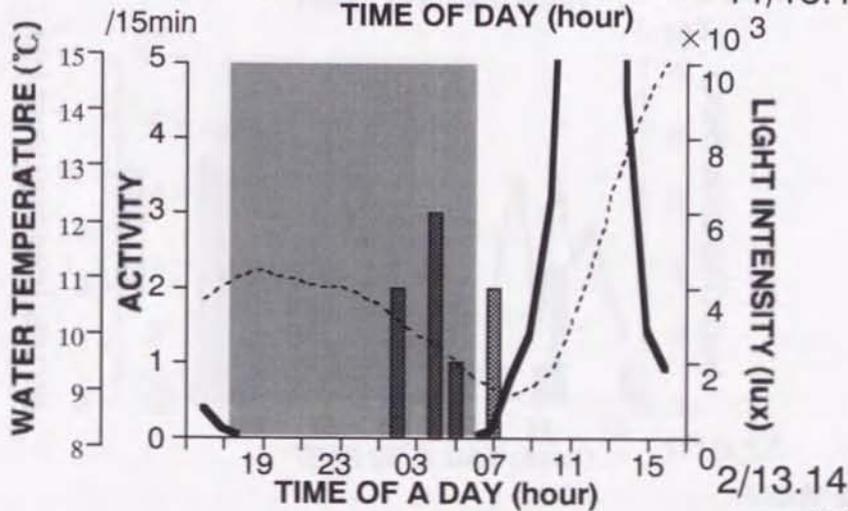
SUMMER



AUTUMN



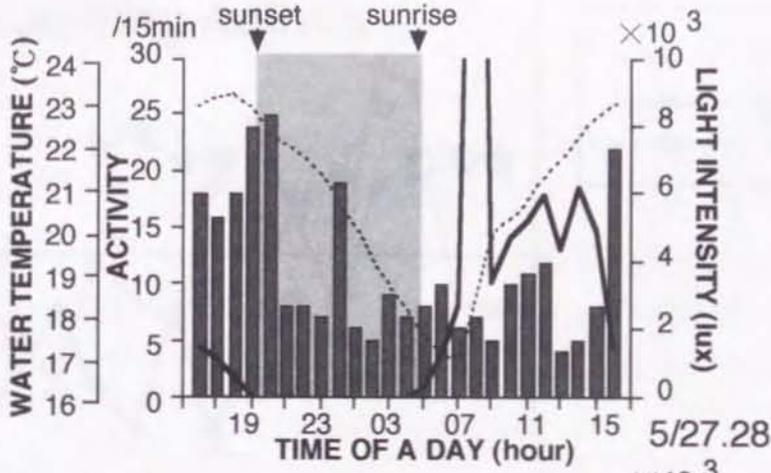
WINTER



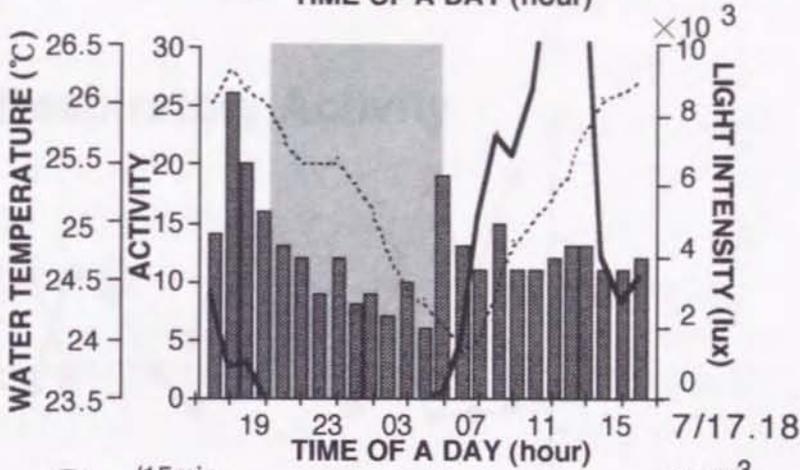
----- Water emperature
 ————— Light intensity

Fig. 5 The results of Mating Activity by observation.

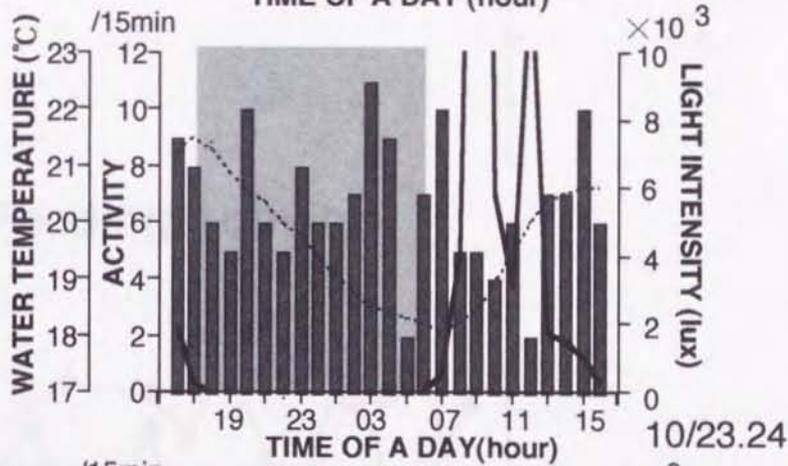
SPRING



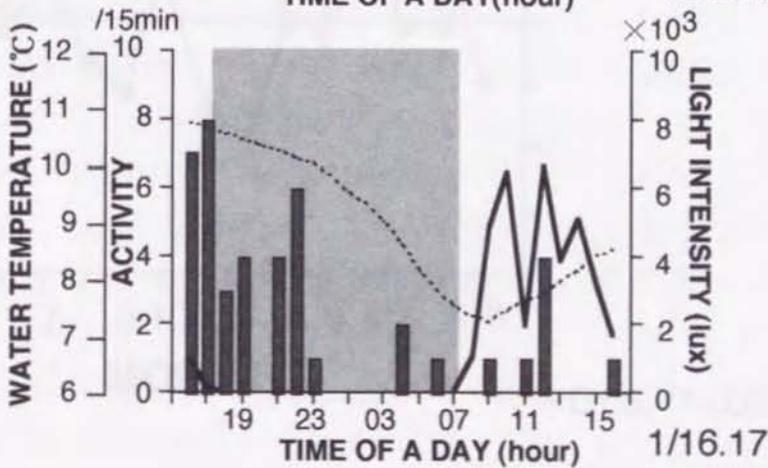
SUMMER



AUTUMN



WINTER



— Water emperature
 — Light intensity

Fig. 6 The results of Respiration by observation.

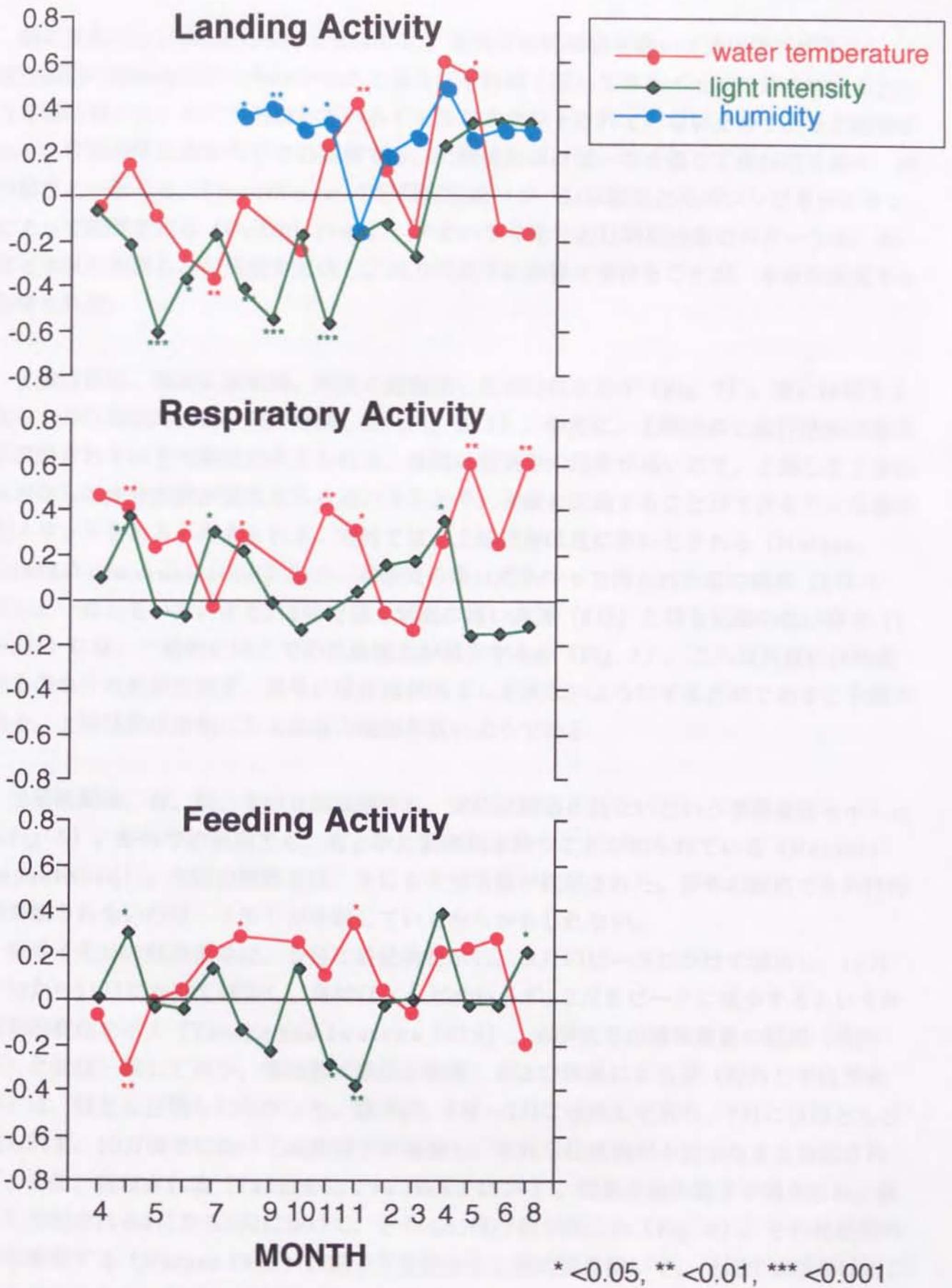


Fig. 7 The correlation between environmental factors and behaviors by Kendall's methods.

林によれば(personal communication)、野外では繁殖期を除いて通年夜行性を示し、活動期間の逆転は観察されなかったと言う。それは上陸してきたイモリの数を数えるという方法のせいで、水中で活動しているイモリがカウントされていないためであると説明される。今回の準自然条件下での観察でも、上陸活動はほぼ一年を通じて夜行性であり、林の観察と一致する。Smooth newtの日周期活動パターンは温度と光のコンビネーションによって影響される(Griffith 1985)。アカハライモリの日周期活動のパターンも、照度と水温に相関した日周期を形成し、両方の因子に影響を受けることが、本章の研究でも示唆された。

上陸活動は、湿度に順相関、照度に逆相関した夜行性を示す(Fig. 7)。夏には陸上と水中での日周期的活動位相が分離した(Fig. 2, 3)。ゆえに、上陸活動と這行活動は独立に調節されている可能性が考えられる。夜間は空気中の湿度が高いため、上陸したときに体表からの水分蒸散が抑えられるということや、天敵を回避することができるという適応的メリットもあると考えられる。野外では、上陸活動は夏に多いとされる(Naruse, personal communication)ので、本研究の準自然条件下で得られた夏の結果(6月-7月)と一致していた。また、1年で最も気温の高い真夏(8月)と最も気温の低い真冬(1~2月)には、一時的に陸上での活動頻度が減少するが(Fig. 3)、これは真夏には体表からの水分の蒸散を防ぎ、真冬には体温が低下しすぎないようにするためであると予想される。上陸活動は活発になる温度の範囲が狭いようである。

生殖活動は、春、秋、冬の3回観察され、夏には観察されないという季節変化を示した(Fig. 5)。野外での観察でも、春と秋に繁殖期を持つことが知られている(Hayashi unpublished)。今回の観察では、冬にも生殖活動が観察された。野外の観察で冬の性行動が観られないのは、イモリが冬眠しているからかもしれない。

野外イモリの精巣重量は、5月に最低値を示し、9月のピークにかけて増加し、10月中旬から11月にかけて減少し、冬はほとんど変わらず、2月をピークに減少するという年周期的変化を示す(Tanaka and Iwasawa 1979)。本研究での精巣重量の結果(第四章)とほぼ一致しており、地域差(奈良と新潟)および環境による差(野外と準自然条件)は、ほとんど観られなかった。精子は、3月~5月に成熟しており、7月にはほとんど観られず、10月後半にかけて成熟精子が増加し、それらは成熟が不完全なまま放出されず、消化、吸収される(Tanaka and Iwasawa 1979)。精巣が成熟精子で満たされ、体外に放出される4月から5月にかけて、さかんに性行動が観られ(Fig. 5)、その時期野外でも繁殖する(Naruse 1993)。精子が放出された後の夏を除いて、ほぼ生殖活動は起こると考えられる。精巣の成熟サイクルと関連したメカニズムにより、生殖活動が発現している可能性が示唆された。

本研究で、生殖活動は朝と夕方に観られる明確な日周期を示した。Griffithの観察では、Smooth newt, *T. vulgaris* の生殖活動は、春に夕方にピークを持つ日周性を示した。そのことについて、*T. vulgaris* は、生殖行動を示す環境の照度に、範囲があると説明している (Griffith 1985)。イモリは婚姻色を示すので、フェロモン (Kikuyama et. al. 1995) や水の振動 (松井 1996) と同様に、視覚も関与しているかもしれない。イモリは薄明薄暮に活動するが (Fig. 2-6)、そのような生物は一般に薄明のとき、最もよく見えると言われることから説明できる (千葉 1996)。日本産イモリ *C. pyrrhogaster* は、野外では一日中生殖活動を示した (Hayashi 1989) と報告されているが、生殖活動の見られる状況は地域差があると報告されており (Sawada 1963)、環境の違いによると予想される。室内実験にのみ用いた個体も、自然状態で飼育された個体とほぼ同時期に、婚姻色が観察された (Nagai and Oishi unpublished)。概年リズムがある可能性があり、このように生体内の状態が環境因子の影響を受けながらも、ほとんど独立に変化し、生殖活動の発現に影響する可能性も考えられる。

呼吸活動は、通年水温と相関する傾向があり、春は照度と特に相関する傾向があることが示された ($p < 0.01$) (Fig. 7)。呼吸は水温が高いか、水中の溶存酸素が少ないとき増加すると報告されている (Halliday and Worsnop 1977)。今回の結果でも、水温の高い夕方に多く観察された。しかし、一日で最も低温であるにも関わらず、早朝にも呼吸活動が増加した (Fig. 6) ことは、光刺激が誘発している可能性がある。*T. vulgaris* の呼吸活動は生殖活動の際増加した (Czopek 1959, Halliday and Sweatman 1976, Griffith 1985)。今回得られた結果では、生殖や這行など他の活動に相関しておらず、アカハライモリの呼吸活動は他の行動よりも、直接的に温度や光といった物理的環境因子によって影響されるようである。

以上の考察を踏まえて、準自然条件下で概日リズムに季節変化が見られたのは、次のように考えられる。

日周期リズムは不安定で変動しやすく、時計と行動の発現との間のカップリングは弱いため、湿度、温度といった物理環境因子が強く日周期活動に影響するようである。体が小型で変温動物なので、体内の恒常性を維持することが、比較的困難であると考えられ、時計とのカップリングが弱い方が、適応的である可能性もある (大石 1991)。水温の変化は、冬に活動位相の逆転を引き起こすようである。冬期に日周リズムの昼夜逆転が観察されたが、それは、比較的温暖な日は昼行性を示し、比較的寒冷な日は夜行性を示していることから、温度の影響が考えられる。また、行動内容によって異なる環境因子に影響を受け、異なる日周リズムを示した。かつ行動内容ごとに異なる季節変化を示した。それが水中での這行リズムの季節変化の要因の一つになっていると考えられる。即ち、春には、早

朝あるいは夕方に生殖活動が活発になり、その結果として、春は這行リズムが昼行性であると予想される。一方、夏には生殖行動は観られず、低照度で高湿度を選択する上陸活動が活発化する。その時期、水中の這行リズムが夜行性を示した。また、真夏に上陸活動が減少すると昼行性を示した。このような水中の這行リズムの春と夏の昼夜逆転の一つの原因として、生殖活動の発現と上陸活動の頻度の増減があげられる。繁殖期には通常と異なる日周性を示すことが、魚でも報告されている(佐原 1989)。他の生物でも、繁殖行動の日周期的活動パターンによる概日行動リズムへの影響があるかもしれない。8月下旬から9月にかけての上陸活動の減少は、体表の水分の蒸散を防ぐためと考えられる。同時期に、深夜を除いて水中でほぼ一日中活発に這行活動を行っているが、水温の上昇で代謝が上がり活動が活発になる一方、陸上での活動が回避されるため、水中での活動が増加したと考えられる。水温の上昇と上陸活動の減少が水中での這行活動の増加と延長を導いている因子の一つと考えることができる。

このことから、一年を通じて記録された昼夜逆転のいくつかは、外的要因のみでなく、性行動の発現といった内的要因(第四章)も含む行動内容の変化が強く働いて、引き起こされていると考えられる。

3. 概日行動リズムに關与する環境要因の解析

3-1. 序論

準自然条件下で概日リズムの位相（昼夜行性など）に季節変化が見られたことは、行動内容によって關与する環境因子が異なり、行動内容によって日周期リズムが異なる（第二章、Nagai and Oishi 1998）ことから、季節による行動内容の変化が一つの要因であることが示唆された。

そこで、室内実験で行動ごとに、環境要因と行動リズムの關係を、さらに詳細に解析した。

魚類の遊泳リズムは、個体差が大きく、不明確で、数日でリズムを消失する個体も見られる。昼行性か夜行性かも、個体差がある（大石 1991）。昼夜逆転する季節変化が觀察されることについて、水温との關連で述べられている（Albert 1984, Yokota and Oishi 1992）。魚類の松果体には光受容機能があるとされるが、カワカマスの網膜と松果体でメラトニン前駆体であるNAT活性に、光のみならず温度の影響も示唆されている

（Falcon et al. 1996）。カワカマスの松果体は振動体機構の他に、光あるいは温度による同調機構も有していると考えられる。また、産卵リズムはカップリングが強いのに対し、遊泳活動と時計のカップリングが弱く（Ueda and Oishi 1982）、魚類においては、概日遊泳リズムが環境因子に影響されやすいと、考えられている（大石 1991）。

Feedingとlocomotor activityの記録を比較したところ、それぞれのリズムの位相が独立に決定されていることから、異なるシステムで調節されているという報告がある

（Senchez-Vzquez et al. 1996）。魚類の松果体には、光受容機能と時計機能があり、これらによるメラトニン産生リズムが観られる（Bolliet et al. 1994, 1996）。松果体切除により、フリーランニング周期が季節に従って変化したり、薄明薄暮型になることから、松果体が二つの振動体のカップラーとして、働いていると考えられている（Kavaliers 1979）。Goldfishの網膜、ゼブラフィッシュの網膜と松果体の両方に、メラトニン合成とそれを調節する時計がある（Iigo et al. 1995）。Salmonの松果体は、メラトニンリズムがDD下で消失する（Iigo et al. 1997）。また、眼球、松果体を摘出して行動リズムが持続するので、網膜、松果体以外にも振動体が存在するとされる（Tabata et al. 1991）。このように、魚類は種間で時計の場所や機能に違いがあることが觀察されている。種によって複数の振動体を持つと考えられている。

陸生の爬虫類の概日行動リズムは明確で、鳥類、哺乳類と同様に明確な周期を示す。

*S. occidentalis*において、松果体除去により、フリーランニング周期が大きく影響を受ける (Underwood 1981)。また、培養下での松果体で、恒常条件でフリーランニング周期を示すことから、松果体に時計があると考えられる (Tosini and Menaker 1995)。Anolesの松果体で、短期間のメラトニン分泌のフリーランニングリズムが観られることから、概日振動体機能を持つとされる (Pickard and Tang 1993)。イグアナトカゲでは、SCNを破壊すると、概日リズムが消失することから、SCNに時計があると考えられている (Janik and Menaker 1990)。同様に、イグアナの培養松果体で、メラトニン分泌にフリーランニングリズムが観られないこと、這行のフリーランニングリズムに眼球除去の影響が観られないことから、眼球、松果体には時計が無いと考えられている (Janik and Menaker 1990)。イグアナは、松果体除去で体温のリズムが消失し、松果体、頭頂眼の両方の除去で這行リズムが消失する。イグアナのこれらのリズムは、異なる器官の異なる役割をもつマルチオシレーターシステムにより、構成されていると考えられている (Tosini and Menaker 1998)。魚類でも指摘されているように、このような種間差が大きいのは、下等脊椎動物の特徴である。松果体摘出でフリーランニング周期が変化したり、位相反応曲線が変化することから (Underwood 1986)、松果体が光受容と振動体の両方に関与していると考えられる。爬虫類の松果体は、光熱トランデューサーとして、機能していると考えられており (Underwood 1990)、温度にも影響を受ける。松果体神経束は、脳に投射しているが、その神経線維数は系統発生的に減少する傾向にある (Underwood 1991)。松果体機能の重要性が、進化過程で減少していると考えられる。

系統進化的に水生の魚類と陸生の爬虫類の間にあたり、水陸両生の両生類について、異なる複数の行動リズムについて、環境要因との関係で、リズム形成の性質を比較した報告はほとんど観られない。

*Xenopus*の網膜で、培養条件で、serotonin N-acetyltransferaseに概日リズムが観察されている (Besharse and Ivovone 1983)。また培養下で自律振動を行うことから、時計が存在することが論証されている (Cahill and Besharse 1990, 1991, 1993, Green and Besharse 1994, Green et al. 1995, Hasegawa and Cahill 1997, 1998)。ヒキガエルでも、網膜で時計機構が報告されている (Korenbroit and Fernald 1989)。成体になっても水中生活を行う原始的な無尾両生類であるアフリカツメカエルは、比較的安定したリズムを示し、時計は、眼に加え、脳のSCNにも存在することが示唆されている (Harada et al. 1998)。BufoとRanaの両種で、眼、松果体で、NAT合成、メラトニン分泌の概日リズムが報告されている (Serino et al. 1993)。Ranaの網膜で、メラトニン前駆体のMethoxyindoleに24時間周期の合成リズムが、神経細胞層部分に観られる (Flight et al. 1983)。従って、Ranaは網膜に、Bufoは網膜に加え、松果体にも、概日

振動体の存在が示唆される。両生類についても、眼球、松果体のメラトニンリズムは、光のみならず温度の影響を受ける (Delgado and Vivien-Roels 1989)。

系統進化的に重要な位置を占める有尾両生類の行動リズムを詳細に解析した研究は、Chibaらのアカハライモリを用いた仕事 (Chiba et al. 1993, 1995, Chiba and Aoki 1987, 1989) を除いて、ほとんどなされていない。今までの報告から、このアカハライモリは、体内に時計を持つが、行動とのカップリングが比較的弱いことが知られている。また、破壊実験から複数の振動体があると予想されている (Chiba et al. 1993)。間脳頭頂部を光遮断操作を行うと同調しにくくなることから、松果体が同調機能に強く関与していると考えられている (Chiba and Aoki 1989)。アカハライモリは光サイクルを第一同調因子とするが、温度にも同調し、照度と温度との相互関係で位相が決定されていると考えられている (Griffith 1985)。

本章では、環境を光と温度に限定して、室内で様々な条件を設け、アカハライモリの這行活動、呼吸活動、上陸活動のリズムを記録した。そして、有尾両生類の概日リズム形成の性質を明らかにし、個体レベルでのマルチオシレーターシステムについて考察した。

3-2. 材料と方法

<記録方法>

恒温室内で、プラスチック製水槽 (31.0L×17.0W×21.5H cm) に、業者 (浜松生物教材株式会社、静岡) から購入した成体アカハライモリ *Cynops pyrrhogaster* を一頭ずつ投入し、上下二箇所フォトセル (PHOTO MASTER PL-3: Hokuyo Automatic) を設置し、デジタルデータレコーダー (DDR-3010: SANYO Electronic Joint-stock) でその活動を記録した (Fig. 1)。そのとき、下のフォトセル (底から2.0cm) では水中での這行活動を記録した。水槽内でのイモリの行動は、ほとんどが水中で底面を這う行動である。上のフォトセル (底から11.0cm) では水を底から15cm入れた場合水面下に赤外線 (底から11cm) を通して、水面上に鼻孔を出して行う呼吸活動を、あるいは水面上に木片を取り付け、その上に赤外線を通し陸上での這行を上陸活動として記録した。同様の実験を2回繰り返し、同じ傾向であることを確認した後、結果を合わせて、表にまとめた。餌は約3週間に一度ランダムな時間に人工飼料 (OBS: オリエンタル酵母工業株式会社、東京) を与えた。

同調に5日間程要するため、設定後10日間から2週間はその状態を維持し、活動位相が安定するのを待った。温度設定を行うにあたって室内の気温による調節を行うため、記録地中温度計Z (Shimadzu rika instruments) を用いて水槽内の水温を記録した。また、準自然状態で季節変化が見られたことを考慮して、設定を行った季節を記録し、室内実験でも季節的な変化が見られる可能性も含めて、その結果を考慮した。

<設定条件>

実験1 明暗 (LD) サイクルの設定

25°C下で、12:12 (時間)のLDサイクルを設定し、這行活動、呼吸活動、上陸活動について記録した。明期の照度は、10 lx (0.7 m watt)と500 lx (3.5 m watt)で、記録した。以下、その設定条件をまとめた。

Cycle	照度	気温 (水温)	設定期間
LD12:12	500 lx	25°C (21°C)	8月
LD12:12	10 lx	25°C (21°C)	2月-3月

LD: Light and Dark cycle

実験2 照度 (HiLi) サイクルの設定

温度一定条件下で (25°Cあるいは20°C)、異なる照度 (Hi : 500 lx、Li : 10 lx) を12時間ごとに交互に設け、這行活動と呼吸活動について記録した。

Cycle	照度	気温(水温)	設定期間
HiLi12:12	500 lx : 10 lx	25°C (21°C)	6月
HiLi12:12	500 lx : 10 lx	20°C (17°C)	8月

Hi: High light intensity, Li: Low light intensity

実験3 温度 (HtLt) サイクルの設定

恒明 (0 lx、200 lx (1.4 m watt)、10 lx) 条件下で、温度サイクル (Ht : 25°C、Lt : 20°C or 15°C) を設定し、這行活動と呼吸活動について記録した。温度は気温により調節した。水温は、高温設定してから徐々に上昇し、高温設定時刻の一時間後を最高水温 (19.5°C) として、そのピークを境に徐々に下降し続け、低温設定時刻の一時間後に最低水温 (12.3°C) に達した。

Cycle	照度	気温 (水温)	設定期間
HtLt12:12	200 lx	20°C : 25°C (18.5°C : 21.8°C)	8月
HtLt12:12	10 lx	15°C : 25°C (12.3°C : 19.5°C)	4月
HtLt12:12	0 lx	15°C : 25°C (12.3°C : 19.5°C)	11月

Ht: High temperature, Lt: Low temperature

実験4 明暗+温度サイクル

明暗 (LD) サイクルと温度サイクルを同時に設定し、活動ごとに記録した。明期が10 lxの LD (L: 9:00-21:00) サイクルを設定し、同時に15°C:25°Cの温度サイクル (Ht: 9:00-21:00) を与えた。次に、引き続きLDサイクルはそのままにして、温度サイクルのみを逆転し (12時間シフト)、21:00-9:00 を高温 (Ht) にし、活動時間帯の推移を検討した。

Cycle	照度	気温 (水温)	設定期間
LD+温度12:12	10 lx	15°C:25°C (12.3°C:19.5°C)	1月-3月
LD+温度12:12	10 lx	25°C:15°C (19.5°C:12.3°C)	1月-3月

実験5 フリーランニング周期の計測

這行活動、呼吸活動、上陸活動について、恒常条件下でフリーランさせ、その周期を記録した。安定するのに、5日間程要するため、20日以上放置し、安定した後半部の約10日で周期を計算した。After effectを考慮して、前条件をLDサイクル(12:12)で統一し、同調させた後、恒常条件下に移行してフリーランさせた。温度 (20°Cと25°C) と照度 (0 lx と500 lx) を変えて、比較検討した。

Cycle	照度	気温 (水温)	設定期間
DD	0 lx	25°C (21°C)	12月
DD	0 lx	20°C (17°C)	6月-7月
LL	500 lx	25°C (21°C)	12月-1月

DD: constant Dark, LL: constant Light

<解析方法>

視覚的検討を行うため、コンピュータ(PC9801 VX: NEC)によりevent recorder actogram をダブルプロットで打ち出し、タイプ別に分けて表にまとめた。行動リズムが設定した環境条件に同調していたか否かを区別し、次に同調を示した個体について、平均活動量以上の活動が、どの時間帯に観られるか判定した。フリーラン周期は、 χ^2 -periodogram をJES JOB LOG-SYSTEM M770-MODE JAPANにより、計算した。有意水準は、99%に設定した。統計計算には、BASICによる統計処理、Fisher's testおよびChisquare testを用いた。

3-3. 結果

<LDサイクル>

25°C下、12時間のLDサイクルを設けたところ、10 lx下では這行活動は66.7%、呼吸活動、上陸活動は70%の個体が明暗への同調性を示した。500 lx下では這行活動は90%、呼吸活動は28.6%、上陸活動は60%の個体が同調性を示した(Fig. 8、Table 1)。同調した個体のうち、明期の照度が10 lxでは、這行活動は65%、呼吸活動は57.14%、上陸活動は87.5%が昼行性を示し、500 lxでは這行活動で87.5%、呼吸活動で75%、上陸活動で83.3%が夜行性を示した(Fig. 8、Table 1)。明期の照度が10 lxでは、這行、上陸活動ともに昼行性を示す傾向が強く、500 lx下ではどちらも夜行性を示す傾向が強かった。この違いを χ^2 -testで検定したところ、這行活動は $p < 0.05$ で、上陸活動は $p < 0.01$ で、統計的に有意であった。準自然条件下で、上陸活動は照度に逆相関する傾向が見られる(第二章、Nagai and Oishi 1998)ので、自然状態の光条件と比べると、照度差は小さいが、比較的低照度で活動し、比較的高照度では光を回避する傾向が、実験条件下でも窺われた。

<HiLiサイクル>

490 lxの照度差においては、這行活動、呼吸活動ともに、LDサイクルに比較して同調個体が少なく、安定に達するのに期間も要した(Fig. 9、Table 2)。25°Cで、呼吸活動で22.2%、水中での這行活動で10%が同調を示し、20°Cでは、呼吸活動で44.4%、這行活動で50%が同調した。その他の個体については、影響の見られた個体もあるが、同調には至らなかった。同調する個体数は温度によって異なり、両方の活動において20°Cの方が多く見られた。活動内容によっても、活動時間帯は異なった。呼吸活動は、同調を示した個体の全てが高照度のとき活動し、這行活動はバラついた結果となった。イモリにおいても、照度の変化が同調要因になり得るが、500 lx : 10 lxの照度比は、10 lx : 0 lxの照度比よりも、弱い同調因子であることが、明らかとなった。

<温度サイクル>

恒暗あるいは恒明条件(10 lx、200 lx)下、温度サイクル(25°C:15°C、25°C:20°C)を12時間サイクルで設けて、温度の影響を見ると、恒暗条件で温度サイクルに同調した個体のうち、這行活動は62%、呼吸活動は75%が高温で活動した。這行活動は10 lxの恒明条件で82%が低温で活動するようになり、この傾向は200 lxでも継続した。呼吸活動は、10 lxの恒明条件では82%が高温で活動し、恒暗条件での結果と同じ傾向を示したが、200 lxの恒明条件では87%が低温で活動し、逆転の傾向が見られた。(Fig. 10、

Table 1 LD cycle: The activity patterns under LD (12:12 hour) cycle with different light intensities in 25°C. The figures showed the number of individuals.

Intensity during light phase	Locomotor activity			Respiratory activity			Landing activity		
	Entrained		Not Entrained	Entrained		Not Entrained	Entrained		Not Entrained
	Light	Dark		Light	Dark		Light	Dark	
10 lx	13	7	10	8	6	6	7	1	2
500 lx	6	16	7	1	3	10	1	5	4

x²-test: *p<0.05, **p<0.01

Table 2 HiLi cycle: The activity patterns under teh cycle (12:12 hour) with changing High and Low light intensity in 25°C and 20°C. Hi: High light intensity (500 lx) active type, Li: Low light intensity (10 lx) active type.

	Locomotor activity			Respiratory activity		
	Entrained		Not Entrained	Entrained		Not Entrained
	Hi	Li		Hi	Li	
25°C	1	0	9	2	0	7
20°C	5	7	13	4	0	5

LD cycle

500 lx under 25°C

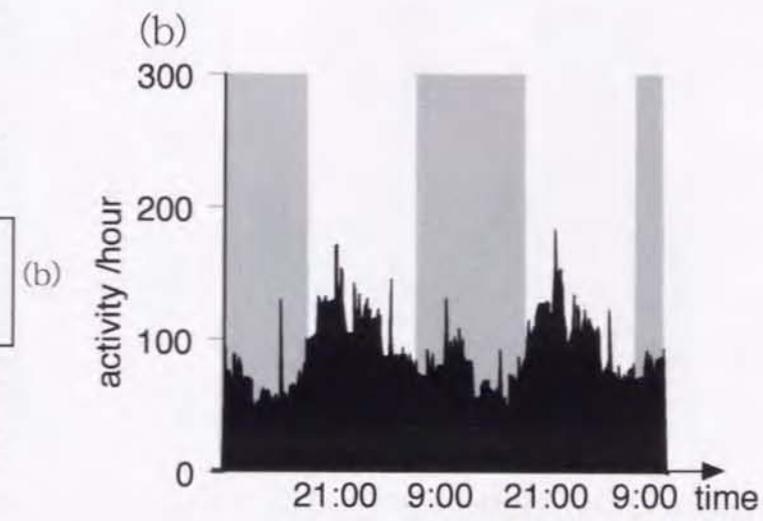
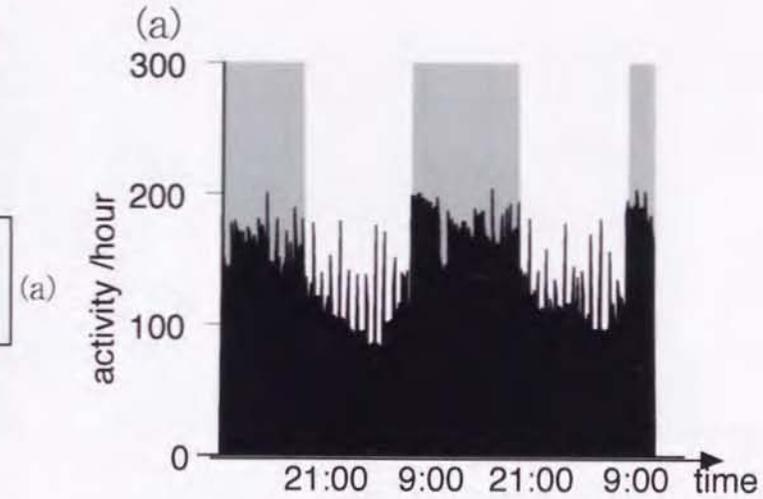
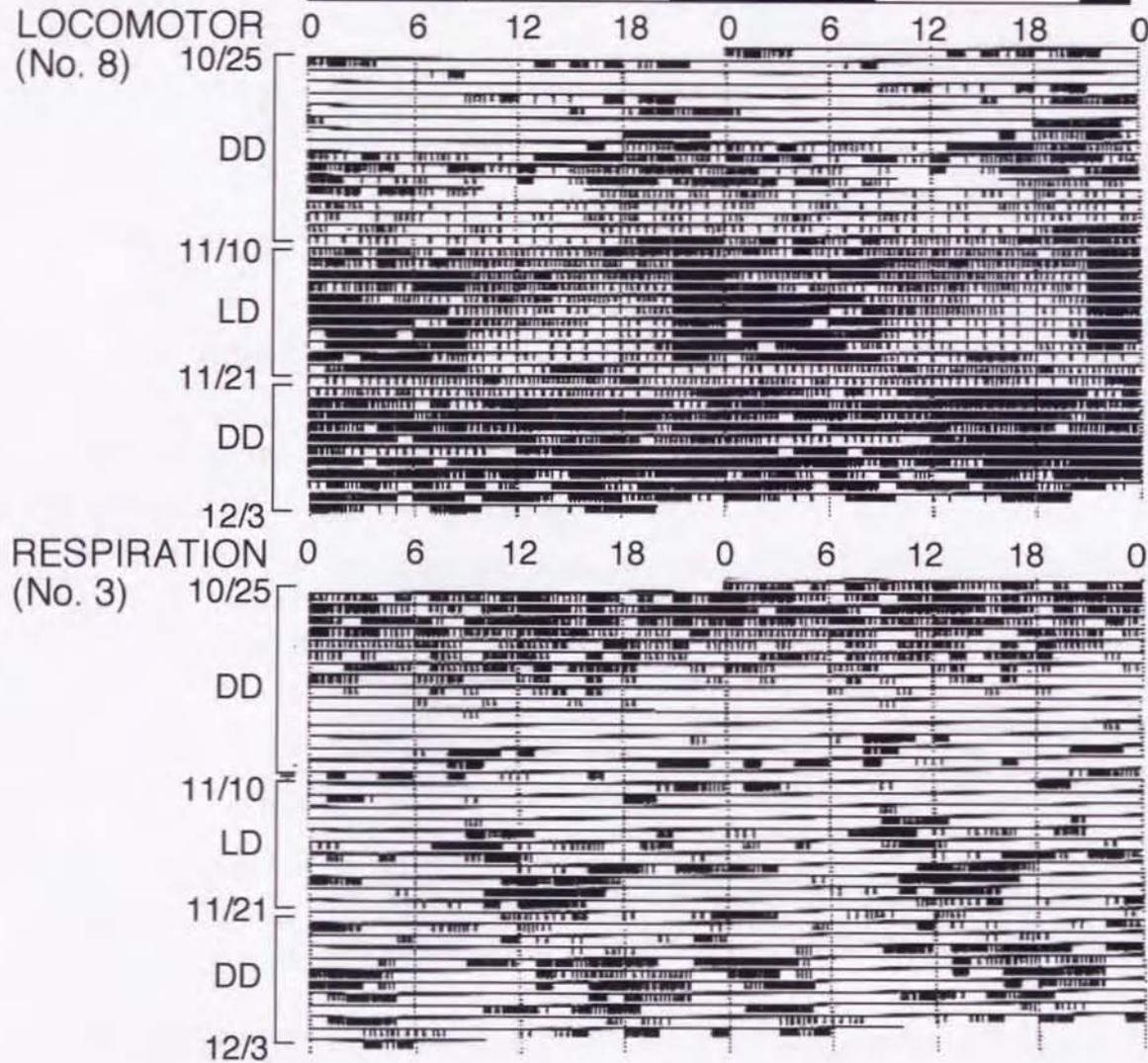
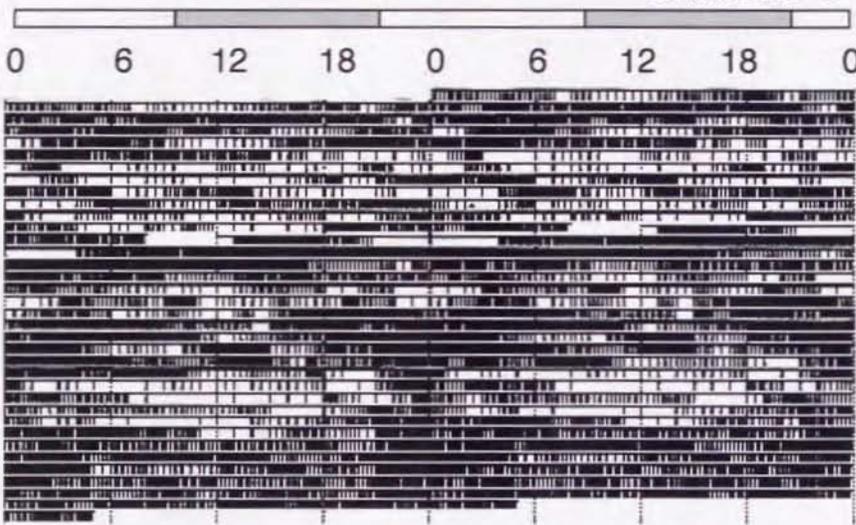


Fig. 8 Examples of locomotor activity and respiratory activity under LD cycle (LD12:12, 500 lx) at 25C. The animals were dnttrained to LD cycle and then, put again in DD to record the free-running rhythms under DD. The upper panel shows locomotor and the lower respiration activity in water. The right graphs show the results of the ground plane analysis by NIH image during periods (a) and (b).

HiLi cycle

under 25°C

LOCOMOTOR
(No. 2)



5/25

10 lx

6/3

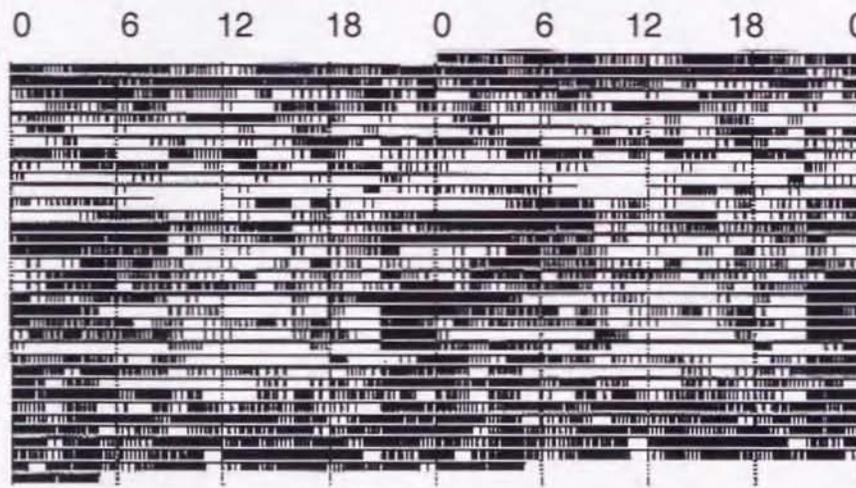
500 lx:10 lx

6/20

10 lx

6/28

RESPIRATION
(No. 2)



5/25

10 lx

6/3

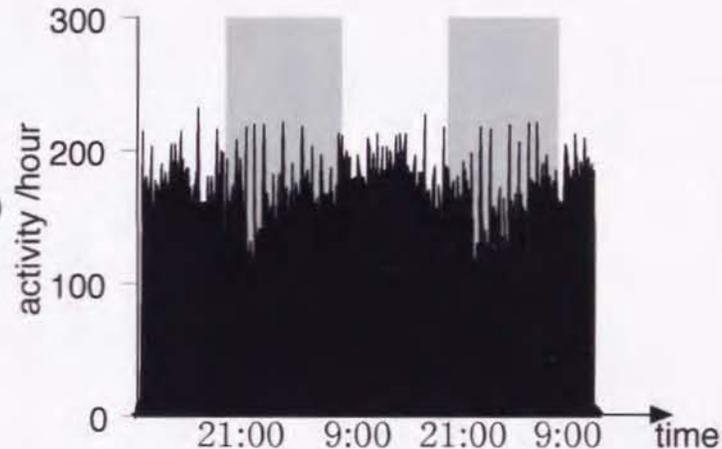
500 lx:10 lx

6/20

10 lx

6/28

(a)



(b)

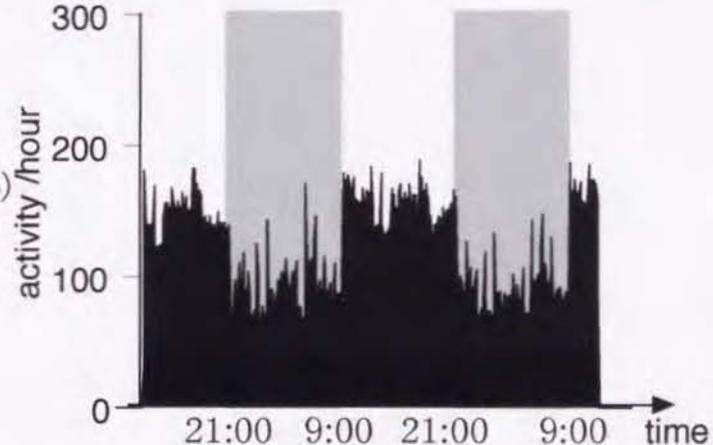


Fig. 9 Examples of locomotor activity and respiratory activity under HiLi cycle (High light intensity (500 lx) : Low light intensity (10 lx)) at 25°C and 20°C. The animals were entrained to HiLi cycle and then, put again in LiLi to record the free-running rhythms. The upper panel shows locomotor and the lower respiration activity in water. The right graphs show the results of the ground plane analysis by NIH image during periods (a) and (b).

Table 3)。這行活動に関しては、10 lxで逆転したのに対し、呼吸活動は200 lxに照度があるまで、逆転しなかった。呼吸活動については、LL (10 lx) での高温での活動からLL (200 lx) の低温での活動への個体数の変化は統計的に有意 ($p < 0.05$) であった。

<LD+温度サイクル>

光サイクルと温度サイクルを両方同時に設けた時、呼吸活動は明期、高温のとき全個体 (9個体) が活動し、温度条件のみ逆転させるとそのうち3個体が暗期、高温に活動が活発になり、明期、低温に活発になる個体数との間に差は無くなった。温度条件を逆転させる前と後の間に有意差が見られた ($p < 0.05$)。一方、這行活動は暗期、低温に8個体中5個体が活動し、温度条件を逆転したとき暗期、高温に6個体が活動し、違いは見られなかった (Fig. 11、Table 4)。呼吸活動は這行活動よりも温度の影響を受けやすく、這行活動は温度よりも光の影響を受けやすい傾向が観られた。このことが呼吸活動と這行活動の活動時間帯を分離する要因の一つと考えられる。準自然条件下で活動内容によって相関する環境因子が異なり、呼吸活動は水温に相関する傾向が見られ、上陸活動はむしろ照度に相関する傾向が見られた (第二章、Nagai and Oishi 1998) が、実験条件下においても支持された。

<フリーランニングリズム>

Fig. 12に見られるように、這行活動は、DD下で明確なフリーランニングリズムが得られた。25°Cより20°Cの方が明確なフリーランニングリズムを示す個体数が多いことがわかった (Table 5)。一方、上陸活動と呼吸活動は、明確なフリーランニング周期を示した個体数の割合に、環境条件による差はほとんど観られなかった。フリーランニングリズムの示しやすさに、照度と温度の影響が観られ、それは行動内容によって異なることが示された。

同一個体で、行動内容ごとに、フリーランニング周期を比較したところ、水中での這行活動と呼吸活動、上陸活動は、異なる周期を示す個体がみられた (Fig. 13)。20°CDDで、行動内容によって周期にそれほど違いの見られない個体 (No.7) もいたが、呼吸や上陸活動は、這行よりも周期が短い個体が比較的多い割合で見られた。また、周期に違いの見られなかったNo.7でも、25°CDDでは、行動内容による周期に違いが見られるようになった。

3-4. 考察

日本産イモリの活動時間帯は季節変化を示す(第二章、Nagai and Oishi 1998)。繁殖期

Table 3 HtLt cycle: The activity pattern under temperature cycle (12:12 hour) in different light intensities. The number shows the number of individuals. Ht: High temperature (25 °C) active type, Lt: Low temperature (15°C or 20°C) active type.

	Locomotor activity			Respiratory activity		
	Entrained		Not Entrained	Entrained		Not Entrained
	Ht	Lt		Ht	Lt	
DD	5	3	2	6	2	2
LL (10 lx)	1	5	4	5	1	4
LL (200 lx)	2	5	3	1	6	3

* P<0.05

Table 4 LD + HtLt cycle: The activity pattern under LD cycle + Temperature cycle. LHt: Light-High temperature, DLt: Dark-Low temperature, LLt: Light-Low temperature, DHt: Dark-High temperature.

	LHt	DLt	LLt	DHt
Respiratory activity	9	0	4	3
Locomotor activity	3	5	2	6

* P<0.05

HtLt cycle

Air temperature

Water temp.

Under DD

25°C
15°C
19.5°C
12.3°C

LOCOMOTOR

(No. 8) 11/15

25°C

11/26

15°C:25°C

12/4

25°C

12/29

RESPIRATION

(No. 8) 11/15

25°C

11/28

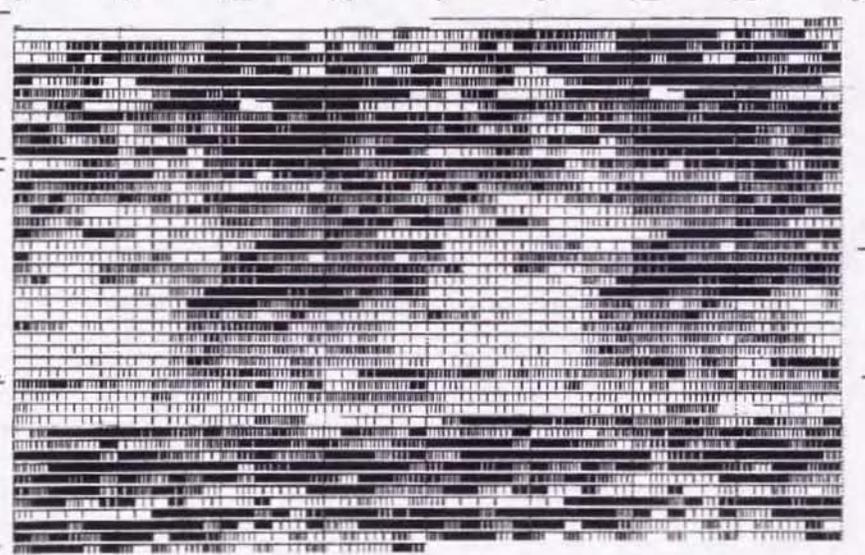
15°C:25°C

12/4

25°C

12/29

0 6 12 18 0 6 12 18 0



0 6 12 18 0 6 12 18 0

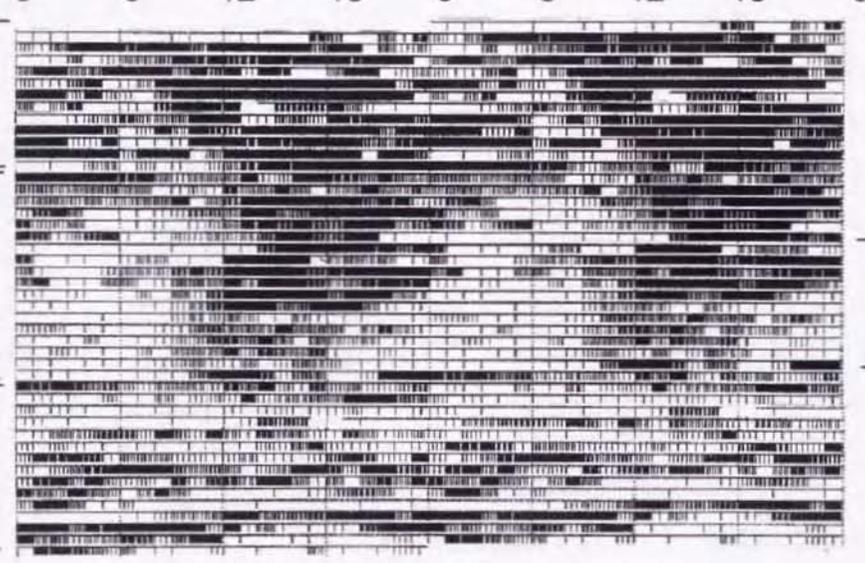
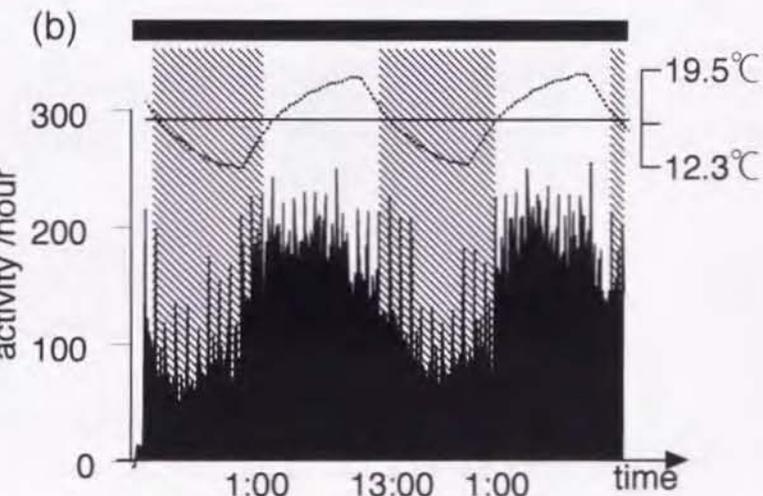
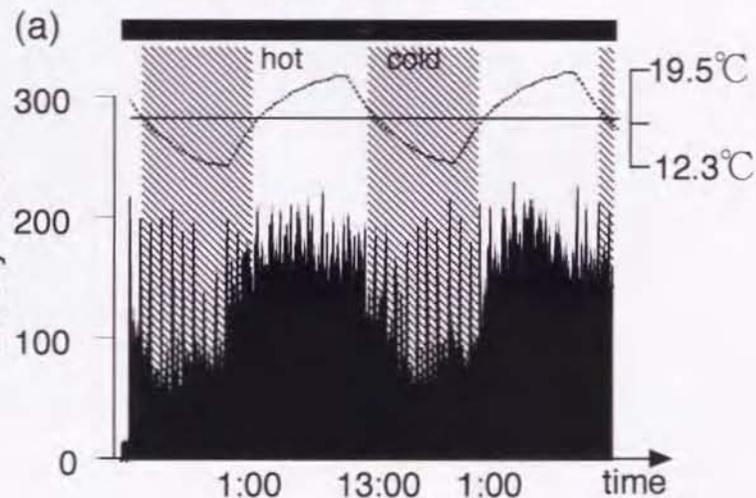


Fig. 10 Examples of locomotor activity and respiratory activity under HtLt cycle (High temperature (25°C) : Low temperature (20°C)) with 0 lx, 10 lx and 200 lx. The animals were entrained to HtLt cycle and then, put again in HtLt to record the free-running rhythms. The upper panel shows locomotor and the lower respiration activity. The right graphs show the results of the ground plane analysis by NIH image during periods (a) and (b).



LD+Temperature cycle

RESPIRATION (upper) AND LOCOMOTOR (lower)
(No. 3)

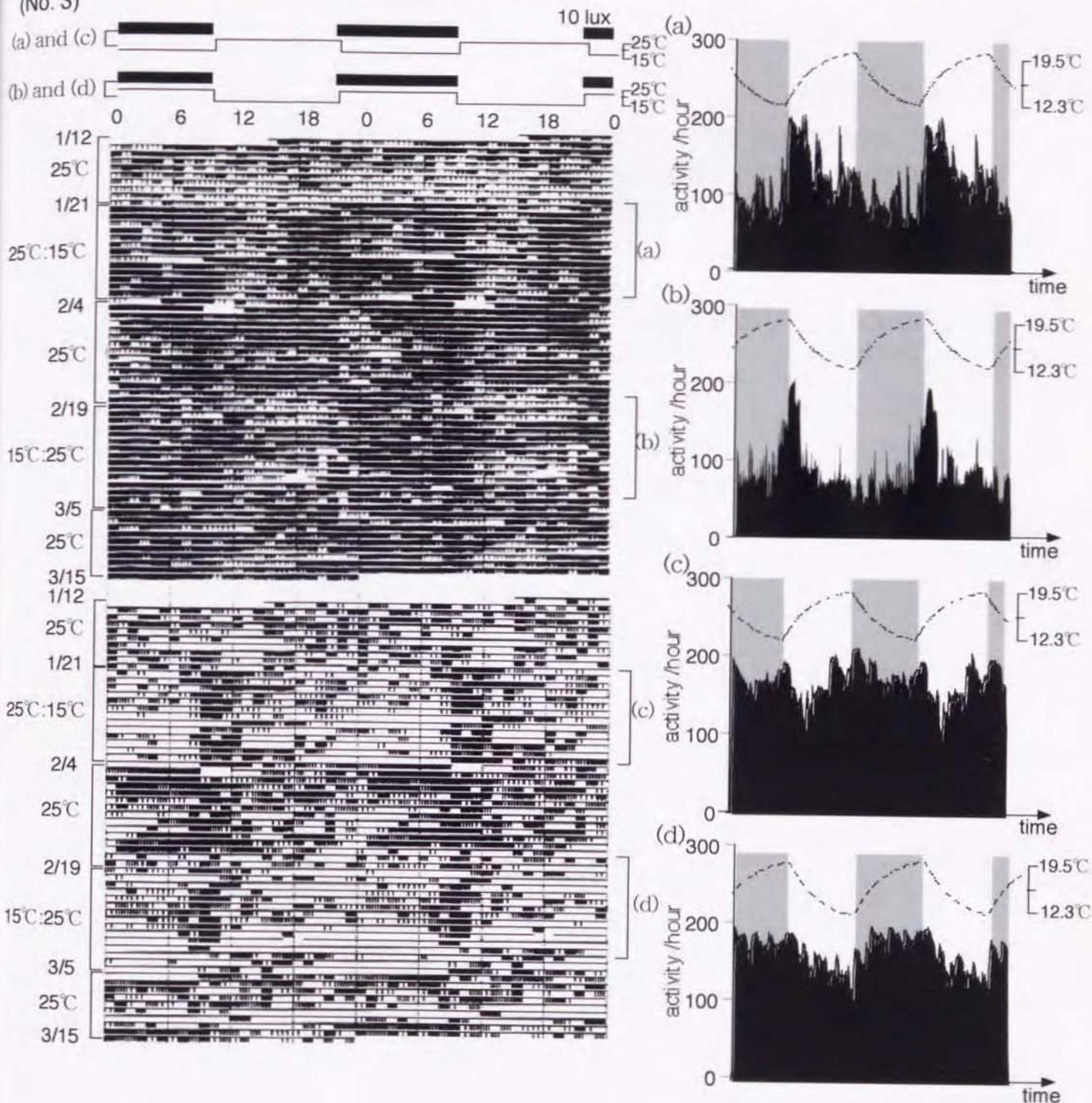


Fig. 11 Examples of locomotor activity and respiratory activity under the combination of light cycle (LD cycle) and temperature cycle (15:25). The experimental conditions were shown on the top of the graph. The upper and lower panel shows respiration and locomotor activity in water, respectively. The right graphs show the results of the ground plane analysis by NIH image during periods (a), (b), (c) and (d).

Table 5 The free-running periods: The numbers (%) mean the proportion that showed clear free-running rhythms under constant conditions.

	Locomotor activity	Respiratory activity	Landing activity
20°C DD	50%	70%	42.9%
25°C DD	31.6%	60%	50%
25°C LL(500 lx)	11.1%	75%	44.4%

Fig. 12. Examples of free-running rhythms under the constant conditions. The left panels show 24 h records of locomotor activity rhythms of the water-walking rat. Free-running rhythms were clear under DD, but not under LL. The right graphs show the results of periodogram.

Free-running rhythms

LOCOMOTOR(No. 7)

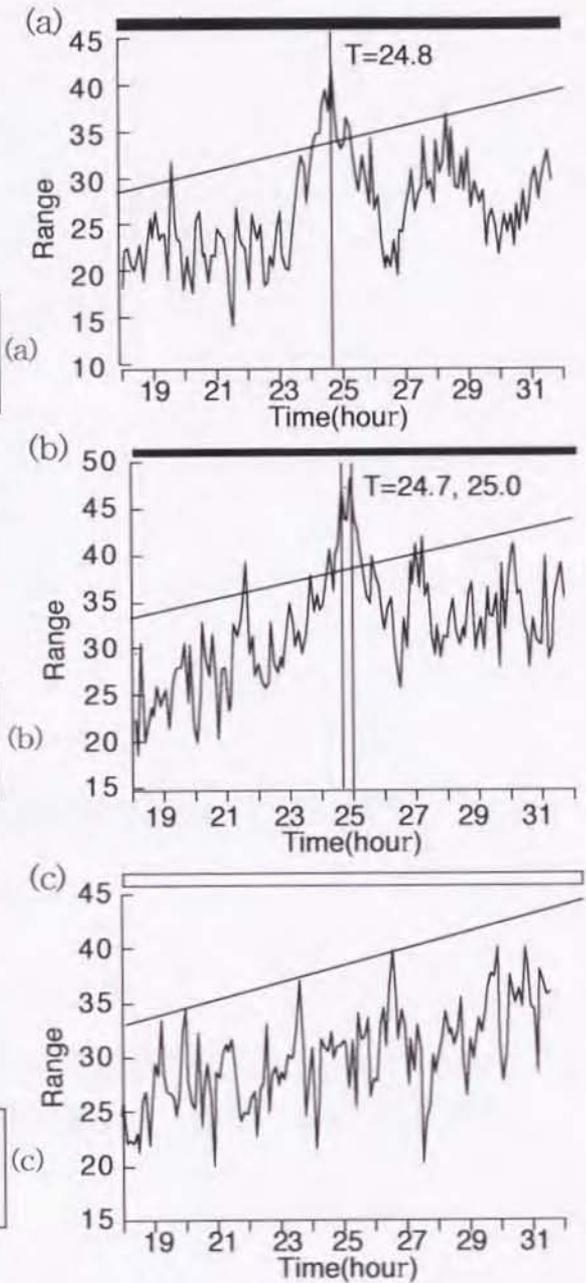
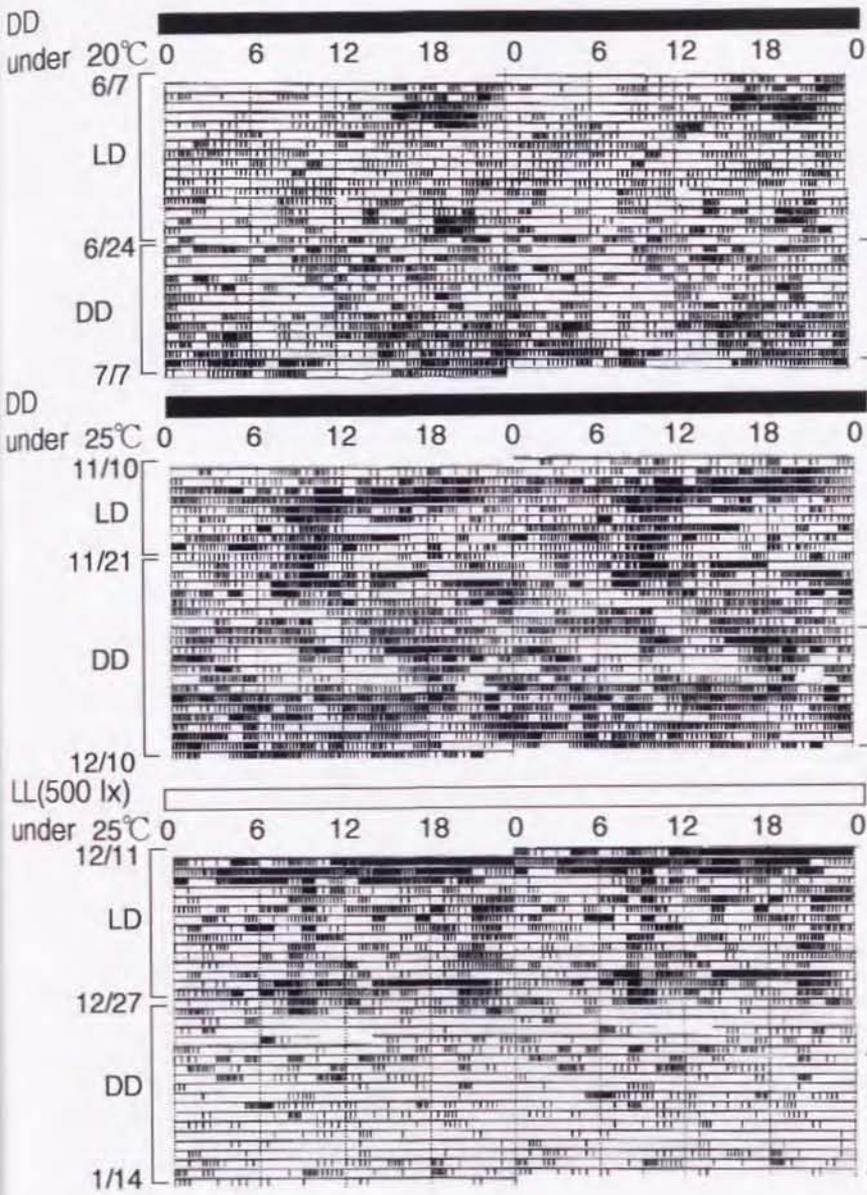
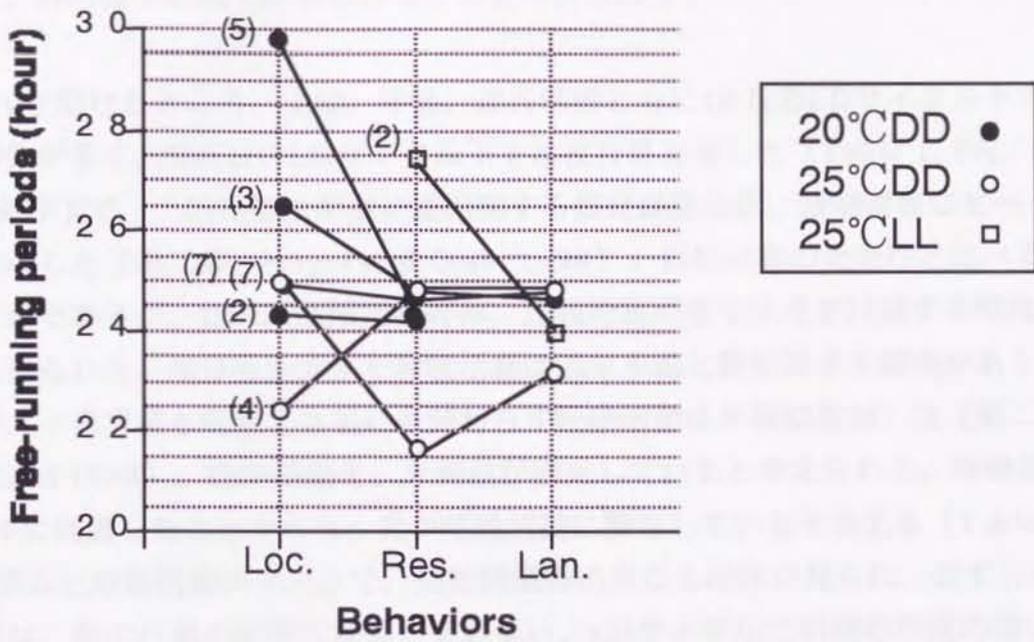


Fig. 12 Examples of free-running rhythms under the constant conditions: The left panels show the records of locomotor activity rhythms of the same individual. Free-running rhythms were clear under DD, but not under LL. The right graphs show the results of periodogram.



significant level : S=99%

Fig. 13 Free-running periods of each behaviors. The numbers in parenthesis mean the individual's number. Loc.: Locomotor, Res.: Respiration, Lan.: Landing.

には通常と異なる日周期を示すが (Hayashi 1989, Naruse 1993)、室内実験にのみ用いた個体も自然状態で飼育された個体と同時期に婚姻色が観察されたことから、概年リズムがある可能性があり、性行動の発現に影響すると同時に水中での這行活動の日周期リズムにも影響を与えていると考えられるので、実験設定の季節を考慮に入れた。しかし、今回の結果に概年リズムの影響は認められず、イモリも魚類と同様に、行動と時計のカップリングが弱く、外的因子に強く影響されるためと考えられる。

LDサイクルを設けたところ、上陸、呼吸、這行活動ともに10 lxのLDサイクル下で昼行性を示す個体が多く、500 lxのLDサイクル下では夜行性を示した (Table 1, Fig. 8)。準自然条件下で、上陸活動は照度に逆相関する傾向が見られ、薄明薄暮にピークを持つ夜行性を示した (第二章、Nagai and Oishi 1998)。自然状態の光条件と比べると照度差はわずかであるが、比較的低照度を好み、比較的高照度では光を回避する傾向が実験条件下でも得られた。準自然条件下で呼吸活動は通年水温と順相関する傾向があることが示されたが、一日で最も低温であるにも関わらず呼吸活動は早朝に増加した (第二章、Nagai and Oishi 1998)。呼吸活動を、光刺激が誘発していると考えられる。呼吸活動もLDサイクルに同調したことからも、光が呼吸活動に関与していると言える (Table 1)。這行リズムと呼吸活動のリズムで、活動時間帯の異なる個体が見られ、必ずしも呼吸活動の増加は、他の行動の影響とは言い切れない。LDサイクルで明期の照度の違いによって、活動位相の昼夜逆転が見られ、light on、offのみならず、照度によって選択される時間帯が異なる。この実験結果からも、活動の最適照度 (Jaeger and Hailman 1973) が見られることが予想された。

照度が活動リズムに与える影響は、早くから知られている。Night monkeyにおいて、照度サイクルを設定したとき、照度の違いの比率よりも、照度上昇や下降といった照度の変化の方が同調因子として働いていると解釈されている (Erkert and Thiemann 1983)。キッシンググラミ (*Helostoma rudolfi*) の遊泳リズムについて、500 lxに対して設定する照度比 (<500 lx) は、小さい程同調する個体が減少し、200 lx差ではわずかな個体数しか同調しなくなるが、5 lxに対して設定する照度 (<5 lux) は数 lxの差でも、多くの個体が同調を示した (大石 1991)。このことから、光同調における光感受性は、Weber's law に従うことが示された。

イモリについても、実験2で、照度の変化に対して同調することが示された (Table 2, Fig. 9)。それはLDサイクルよりも弱い同調因子であり、また温度によって同調性の強度が変化する傾向が示された。

20°Cで、這行活動がどちらの照度も同じ程度に選択しているのに対し、呼吸活動に関しては、同調を示した個体は全て高照度で活動した。照度の増加でも、呼吸量が増加する

のかもしれないが、主に呼吸は、ノンパラメトリックな光刺激に誘発されやすいと考えられる。パラメトリックな光要因に対する感受性は、網膜のオシレーターにあると言われる (Underwood 1981)。松果体よりも眼で照度の変化に同調していると予想され、活動内容による違いは、どのオシレーターとその行動が強くカップリングしているかによると考えられる。また、準自然条件下で薄明薄暮に活動する (第二章、Nagai and Oishi 1998) のは、light on, offに同調している一方で、照度変化も感受していると考えられる。

恒暗あるいは恒明条件で温度サイクルを設定したところ、這行、呼吸活動ともに同調した (Table 3, Fig. 10)。温度への同調は不明確であり、同調に時間を要する (Fig. 10)。光とは異なる同調機構を持つと考えられる。

*T. vulgaris*の呼吸活動は水温が高いか、水中の溶存酸素が少ないとき増加すると報告されている (Halliday and Worsnop 1977)。魚類 (Naruse 1993) や爬虫類 (Underwood 1985, Underwood and Calaban 1987) などの変温動物は、温度サイクルに対する同調性があるが、恒温動物でも、鳥類 (Eskin 1971) や小型の哺乳類 (Aschoff and Tokura 1986, Tokura and Aschoff 1983) で温度への同調性が報告されている。恒温動物は、温度感受性神経を松果体に持つ変温動物と、同調メカニズムが異なる可能性が高い。トカゲにおいて、松果体のメラトニンリズムが温度サイクルに同調し、かつ光サイクルと同時にあるとき、両方の因子の相互関係に影響を受けることが示されている (Underwood and Calaban 1987)。温度サイクルへの同調は、松果体のメラトニンを介して位相が決定されているかもしれない。

照度によって活発になる温度が変化するのも、松果体でのメラトニン変化を介するかもしれない。這行活動が10 lxで、多くの個体で活動位相が、高温期から低温期に移行したが、呼吸活動は200 lxで活動位相が逆転した (Table 3)。活動を誘発する温度は、照度によって異なり、また活動内容によっても異なることも示された。

実験2で、適応照度に温度が影響することが示された (Table 2) が、この実験から、適応温度に照度が影響するということが示された。活動位相を決定する因子として、複数の因子のコンビネーションが予測される。

実験3で、光と温度のコンビネーションによる環境が、這行と呼吸で、影響の仕方に違いの見られたことについて、さらに検討するため、明暗サイクルと温度サイクルを組み合わせ与えた。呼吸活動は明期、高温のとき全個体が活動したが、温度サイクルのみ逆転させるとそれにつられ、温度サイクルを逆転させる前との間に有意差が見られた ($p < 0.05$) (Table 4, Fig. 11)。一方、水中での這行活動は暗期、低温に多くの個体が活動し、温度サイクルを逆転させても変動はほとんど見られなかった。温度よりも光刺激の方

に強く影響を受けると考えられる。また、呼吸活動は這行活動よりも温度の影響を受けやすいと考えられる。行動内容により、影響しやすい因子が異なることが伺われた。このことが呼吸活動と這行活動の活動時間帯を分離する要因の一つと考えられる。準自然条件下でも行動内容によって相関する環境因子が異なり、呼吸活動は水温に相関する傾向が見られ、上陸活動はむしろ照度の影響を受けやすかった(第二章、Nagai and Oishi 1998)。呼吸活動の場合、代謝との関連が密であると考えられるが、実験3では、ある照度では低温期を選択しており、必ずしも代謝の促進が呼吸活動の上昇を導いているとは言い切れない。

行動内容によって両要因の影響のしやすさが違っており、それが異なる行動ごとに活動時間帯が異なる要因の一つになっていると考えられる。また、明暗周期が温度周期よりも同調因子として強く影響しやすいことが示された。

フリーランニング周期は照度や温度によって明確さや周期が変化した (Table 5, Fig. 13)。フリーランニングリズムが明確な個体が少ないのは、概日時計と行動とのカップリングの弱さで説明されるものと考えられる。

這行活動は、照度や温度が上がると、明確なフリーランニングリズムが得られにくくなった (Table 5, Fig. 12)。しかし、呼吸、上陸活動は、LLでの照度かDDでの温度が変わっても、フリーランニングリズムを示す個体数に、それほど影響は無く、フリーランニングリズムの得られ易さは、行動内容によって異なることが示された。

アカゲザルで照度と環境温に従って、周期が一定の規則で長くなったり短くなる (Tokura and Aschoff 1983)。夜行性か昼行性かによっても傾向は異なる (Aschoff's law)。今回の仕事では、照度や温度の変化によるフリーランニング周期の変化の仕方に、一定の傾向は見られなかったが、環境によって周期が変動すること、また環境による変化の仕方が行動内容ごとに異なることは示された。

行動内容によってフリーランニング周期は、異なる値を示す個体が比較的多く、異なる振動体による支配を受けている可能性が示唆された。ある条件で、行動内容によるフリーランニング周期の違いが観られない個体もいたが、環境が変わると、行動内容によって異なる周期を示すようになった。行動内容によって、異なる振動体とカップリングしている可能性が示唆された。呼吸は通常動物の代謝、特に体温と関連していると考えられるが、トカゲで体温と這行活動のフリーランニング周期が分離することが示されており (Tosini and Menaker 1995)、また近年の報告では、破壊する器官によって、どちらか一方のフリーランニングリズムのみ消失することが示されており (Tosini and Menaker 1998)、這行活動と体温を支配する時計が異なることが示されている。本章での実験結果および、準自然条件下での観察 (第二章、Nagai and Oishi 1998) でも、行動内容によって、異なる環境因子に影響され、異なる概日リズムを示したことから、行動

4. ニューロステロイドと繁殖サイクル

4-1. 序論

性ステロイドは、脊椎動物で主に繁殖に関与していると考えられている。両生類では、繁殖の際の雄のコーリングや抱接のとき用いられる筋肉と接合した運動ニューロンのシナプスの性質に、影響を与えることが知られている (Janis and Richard 1995)。このように性ステロイドは、脊椎動物で主に繁殖に関与していると考えられている。

イモリの血中のandrogensとestradiol-17 β の濃度は季節によって変化し、雌に関して秋の間と3月の二つのピークをもつ年周期を示し、雄に関しても、エストラジオールの濃度で10月から11月と3月に二つの年周期的ピークを持つ (Garnier 1985 a,b)。また、血中のprogesteroneにも季節変動が観られ、繁殖に関与していることが示唆されている (Zerani et al. 1991)。カエルで、エストラジオール、アンドロゲン感受性神経は、繁殖コールに関与している (Janis and Richard 1995)。Roughskin newtsも、脳にアンドロゲンとエストロゲンの受容体を持ち、視床下部など各所に分布していることが知られている (Davis and Moore 1996)。

アカハライモリの精巣におけるステロイドホルモン産生細胞の $\Delta 5-3\beta$ -HSD($\Delta 5-3\beta$ -hydroxy steroid dehydrogenase)の酵素組織化学的検出による活性と性徴の消長との関連性が示唆されている (Tanaka and Iwasawa 1979)。イモリについても、ステロイドホルモンの年周期的サイクルは、生殖行動の年周期的発生を引き起こす要因の一つであることが示唆されている。

性ステロイドは脳に直接作用し、性行動を制御していると考えられてきたが、最近脳自身が性ステロイドを合成していることが明らかとなった。哺乳類 (ラット) や鳥類 (ハト、ウズラ) で、多く報告されている (筒井 1996, 1999) が、両生類でも脳でニューロステロイドが合成されていることがわかっている (Mensah-Nyagan et al. 1994, 1996, Do-Rego et al. 1998, Takase et al. 1999)。

両生類の脳でのpregnenolone、pregnenolone sulfateは、主なニューロステロイドとして小脳の機能に関与している。両生類では副腎のステロイド合成に調節しているANF-like免疫陽性神経が、Ranaの小脳purkinje cellに入射していることが観察された

(Lihrmann et al. 1988)。また、Ranaの脳で、pregnenolone sulfateの濃度が繁殖期、繁殖期後に高く、末梢性のステロイド産性の内分泌腺は、pregnenolone sulfateの活性に依存していると考えられる (Takase et al. 1999)。このようなことから、両生類で、脳内のニューロステロイドは、繁殖に関与していると考えられている。

哺乳類では、pregnenolone、pregnenolone sulfateは、GABA-A receptorと相互作用を持つ (Takase et al. 1999)。両生類でも、下垂体のmelanotrophsで、pregnenoloneはGABA-A receptorに影響することがわかっている (Le fall et al. 1997)。pregnenolone sulfateは、GABAを抑制し、GABAergic neurotransmissionのアンタゴニストとして、考えられている (Tsutsui and Ukena 1999)。このように、脳でのGABA-A receptorのステロイドによる調節機構は、哺乳類と両生類で似ていることが知られている (Orchinik et al. 1994)。

本章では、イモリにおいて、ニューロステロイドと繁殖との関係に着目し、(1) 脳内ニューロステロイドの季節変化、(2) 季節変化を引き起こす環境要因の解析、(3) 光周期の受容に関与し、ニューロステロイドの変動を引き起こす器官の解析を行った。

4-2. 材料と方法

<季節変化の記録>

奈良市柳生において採取した成体イモリを、準自然条件下 (大学構内中庭) で飼育し、95年4月から11月まで、約一ヵ月ごとに雄各5個体について生殖腺を採取し、体重、精巣重量を電子天秤 (Mettler AE 166: Mettler, Switzerland) で計測した。また、準自然条件下での繁殖行動の発現の時期との比較には、第二章での観察結果を用いた。

脳内ステロイドの記録には、業者 (浜松生物教材株式会社、静岡) から購入した成熟雄を用いた。光周期処理を行ったイモリと比較するため、それらのイモリと同時に購入したイモリ8個体を、光周期処理を行った時期と同じ期間、準自然条件下で飼育した。

同様に体重、生殖腺重量を計測した後、Ringer solution (0.1MNaCl 112ml, 0.1MKCl 32ml, 0.1M CaCl_2 27ml, 0.1M Na_2HPO_4 5ml) 中で脳を取り出した。脳重量を測定した後、液体窒素で凍結し、 -80°C で保存した。

<光周期設定>

業者 (浜松生物教材株式会社) から購入した成熟雄について、1998年9-10月、1999年3-4月、1999年6-8月の1ヵ月~1ヵ月半の3回にわたり、光周期処理を行った。

25°C 一定下で、長日 (18時間明 : 6時間暗)、短日条件 (6時間明 : 18時間暗) を設定し、各条件に8個体、約1ヵ月~1ヵ月半処理した。処理した個体について、同様に、体重、生殖腺重量を計測し、脳を取り出した。脳重量を測定した後、液体窒素で凍結し、 -80°C で保存した。その後、RIAで脳ステロイド濃度を測定した。

<ステロイド抽出>

凍結した脳を解凍し、10 mM PBSを加えて5 mlにし、氷水中でテフロンガラスホモジェナイザーによりホモジェナイズした。約2,000 cpm/20 μ lの[1, 2, 6, 7-³H]-プロゲステロンを5 ml酢酸エチルと共にそれぞれのチューブに加え、30分間攪拌し、3,000 \times gで5分間遠心した。有機層を回収し、上記の抽出作業を二回繰り返した。酢酸エチル抽出物は空気噴射により溶液を蒸発させた後、70%メタノールを加えて-20 $^{\circ}$ Cで一晩静置した。3,000 \times gで5分間遠心し、有機層を回収した後、沈殿物に70%メタノール2を加え、-20 $^{\circ}$ Cで5分間静置した。3,000 \times gで5分間遠心し、有機層を一つにまとめ空気噴射により溶液を蒸発させた。RIA buffer 1 mlを加えて、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートし、4 $^{\circ}$ Cで保存した。

一方、プレグネノロン硫酸エステルは酢酸エチル抽出後の水層から抽出した。プレグネノロン硫酸エステルの回収率を得る為に、2,000 cpm/500 μ lの[1, 2, 6, 7-³H]-デヒドロエピアンドロステロン硫酸エステルを加えた。50%硫酸を加え、水飽和 NaClを加えた。この処理により、有機溶媒に可溶となったプレグネノロン硫酸エステルを酢酸エチルで抽出を行った。抽出方法は上記と同様である。空気噴射により乾燥させた抽出物に酢酸エチルを加え、水飽和ジエチルエーテルを加えた後、37 $^{\circ}$ Cで1晩インキュベートした。1N NaOHを加え2分間軽く攪拌した後、水層を捨てた。蒸留水を加え同様に攪拌し、水層を捨てる作業を二度繰り返した。有機層を回収し、空気噴射により溶液を蒸発させ、RIA buffer 1 mlを加えて、4 $^{\circ}$ Cで保存した。

<プレグネノロン及びその硫酸エステルとプロゲステロンのアッセイ>

検量線の設定は表1に示す通りである。検量線用のスタンダードステロイドは500 μ lずつ使用した。

検量線の1から8（下表）はそれぞれ二重測定した。サンプルについてはサンプル内ステロイド量が異なる二つの設定で測定し、後で濃度を算出した。設定は、1. プレグネノロン 脳、血漿 20 μ lと100 μ l、2. プレグネノロン硫酸エステル 脳、血漿 100 μ lと500 μ l、3. プロゲステロン 脳、血漿 20 μ lと100 μ lである。

サンプルは二つの画分に分けた。一つは回収率の測定に使い、他方はプレグネノロン、プレグネノロン硫酸エステル、プロゲステロンの測定に使った。RIAではカルチャーチューブにRIA buffer、サンプル、抗体、³Hラベルしたステロイド（プレグネノロン：5,000 cpm/100 μ l又はプロゲステロン10,000 cpm/100 μ l）の順に溶液を加えた。プレグネノロン、プレグネノロン硫酸エステルの測定時にはプレグネノロン抗体

（Radioassay Systems Laboratories, Inc., Immuchem Corp., Carson, CA）を、プロゲステロンの測定時にはプロゲステロン抗体（Scantibodies Laboratories, Inc., Scantec, CA）を100 μ l使用した。溶液を加えたチューブを攪拌し、4 $^{\circ}$ Cで1時間静置した。その後、IgG SORB（The Enzyme Center Inc., Malden, MA）を250 μ l入れて

攪拌し、常温で1時間静置した。2,500×gで15分間遠心した後、液を捨て滴を切ってRIA buffer 900 μlを加え攪拌した。シンチレーターを予め2 ml入れておいたバイアルビンに液を移し、蓋をして軽く振った後、シンチレーションカウンターにかけcpm値を測定した。回収率の測定として、サンプルから200 μlをバイアルビンに取り、cpm値を測定した。得られたcpm値から回収率を求め、検量線を描き、ステロイド濃度を算出した。サンプルに使用した脳重量から脳、血清、血漿におけるステロイド濃度を算出した。

—表—

1. Back ground ; 抗体なし。
2. Total ; 競合ステロイドなし。
3. プレグネノロン 0.05 ngかプロゲステロン 0.025 ng
4. プレグネノロン 0.1 ngかプロゲステロン 0.05 ng。
5. プレグネノロン 0.25 ngかプロゲステロン 0.1 ng。
6. プレグネノロン 0.5 ngかプロゲステロン 0.25 ng。
7. プレグネノロン 1.0 ngかプロゲステロン 0.5 ng。
8. プレグネノロン 2.5 ngかプロゲステロン 1.0 ng。

<破壊実験方法>

業者（浜松生物教材株式会社）から購入した成熟雄を用いた。

手術していない無傷のグループ（I）、両方の側眼を除去したグループ（E）、松果体を除去したグループ（P）、両眼と松果体の両方を除去したグループ（E・P）について、同様の光周期条件で処理した。1999年6～8月の1ヵ月半、各グループ8個体について、処理した。

眼球除去は、眼腔内に解剖鉗を入れ、視神経を切断し、眼球ごと除去した。松果体除去は、頭蓋骨を開け、松果体部分のみ脳膜を切り取り、ピンセットで松果体を剥ぎとった。その後、頭蓋骨を元に戻すか、消毒済みのスポンゼル（止血用ゼラチンスポンジ、山之内製薬株式会社、東京）で開けた穴を閉じた。手術したところは、消毒用のStreptomycin sulfate入のRiger solution（約0.1%）で洗浄、消毒した。

確認のため、手術を行った3個体について、実験個体と同様に約一ヵ月ほど飼育した後、脱灰してブアン固定液で固定し、ヘマトキシリン・エオジン染色で標本を作成した。眼球については、全ての個体について網膜、視神経の再生は観られなかった。松果体については、3個体中1個体については、完全に松果体は除去されていた。残りの2個体については、10個ほどの細胞が残っていたが、微量なので、ステロイド濃度の結果から、問題

にしなくてよいと判断した。

<解析方法>

統計的検定法は、目的に応じて、Two-way Factorial ANOVAおよびOne-way Factorial ANOVA and Multiple comparison tests、t-testsを用いた。

4-3. 結果

<生殖腺と性行動の季節変化>

精巣重量に、季節変化が観察されたが、有意ではなかった (Fig. 14a)。5~6月に最低値を示し、その後10月にかけて増加していく傾向が見られた。

準自然条件下での性行動は、4~7月、10~11月、1~2月の春、秋、冬に観察された (Fig. 14b)。最も盛んに性行動が観察されたのは5月で、精巣重量が軽量のときであった。生殖行動が再開されたのを観察したのは、10月下旬であるが、そのときに精巣重量は最も高い値を示している。

<生殖腺と脳内ニューロステロイドの季節変化>

自然条件下で飼育されていたイモリの生殖腺重量は、9月、10月に最も高く (8月に比べて、 $p < 0.01$)、4月も8月に比べて優位に高い結果が得られた (Fig. 15a)。

イモリの脳がコレステロールをもとに合成するプレグネノロン、プレグネノロン硫酸エステルとプロゲステロンの季節変化を解析したところ、プレグネノロン硫酸エステルとプロゲステロンに有意な変化が観察された。プレグネノロン硫酸エステルとプロゲステロンの濃度は共に10月に最も高く、8月に低い結果が得られた ($p < 0.01$) (Fig. 15c, d)。これらの変化は生殖腺と同様の傾向があることから、生殖腺サイクルと関連している可能性が考えられる。一方、プレグネノロンについては、顕著な季節変化は見られなかった (Fig. 15b)。

<生殖腺成熟と脳内ニューロステロイド変化に及ぼす光周期の影響>

生殖腺重量は、いずれの季節においても、25°Cでの光周期処理による顕著な影響は見られなかった。長日、短日処理を行ったグループで、両方ともに、準自然条件下のグループに対して8月には促進的、4月には抑制的に作用する傾向が見られ、10月には精巣重量が重くなる傾向が見られた (Fig. 16a)。特に8月は短日が促進的、4月は長日が抑制的に作用した ($p < 0.05$)。

脳内ニューロステロイドでは、プレグネノロンとプロゲステロンについて、10月にのみ長日刺激で増加した (Fig. 16b, d) ($p < 0.01$)。4月と8月には、有意な影響は観察さ

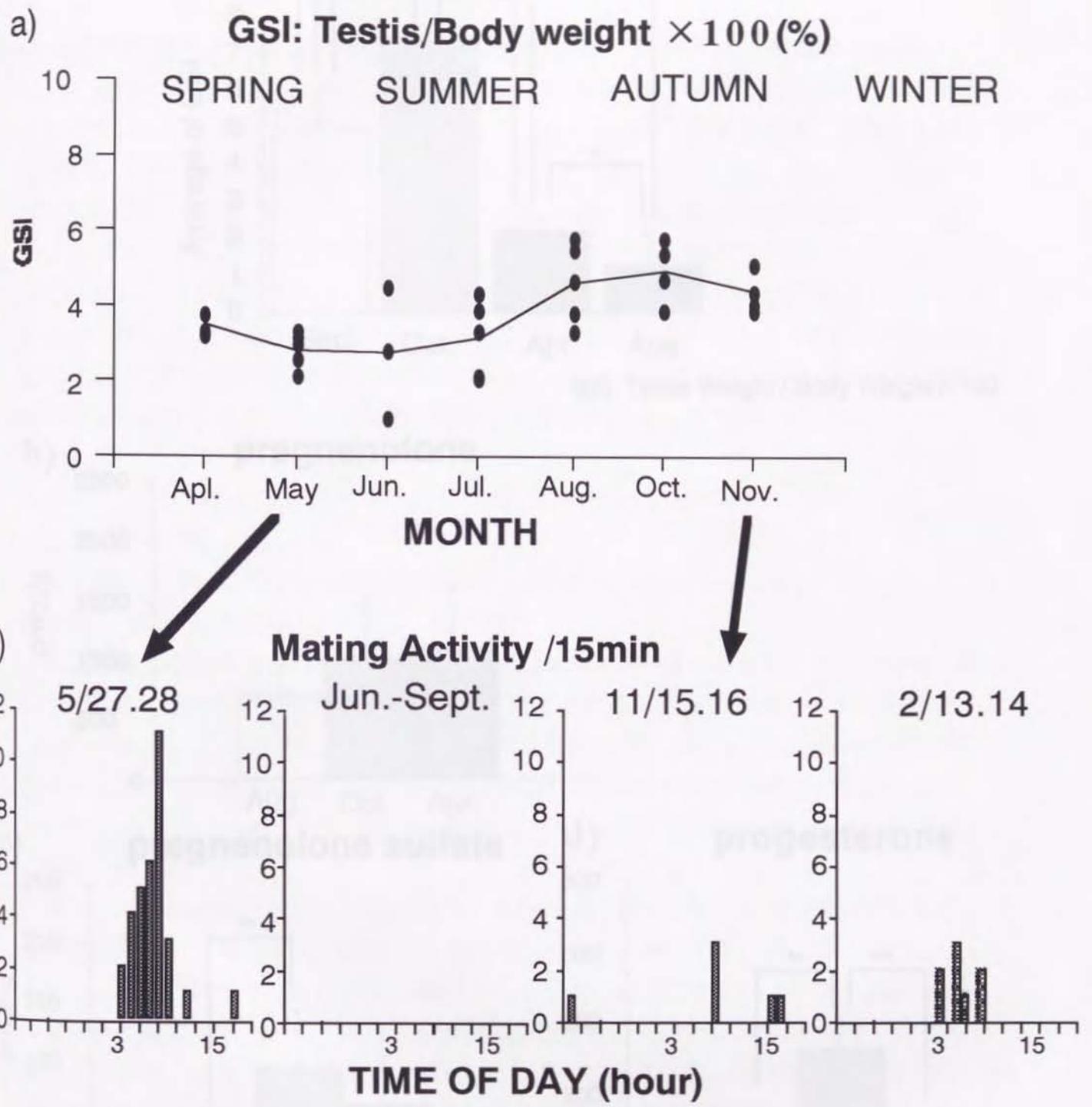


Fig. 14 a) Annual cycle of testis weight. b) Annual and diel cycle of mating behavior of newts.

Fig. 15 Seasonal change of testis weight and neurosteroids in the brain. One-way factorial ANOVA and multiple comparison tests *p<0.05; **p<0.01

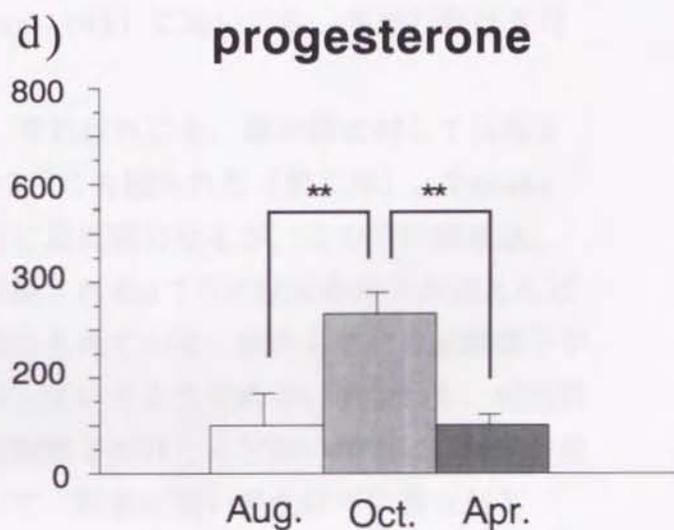
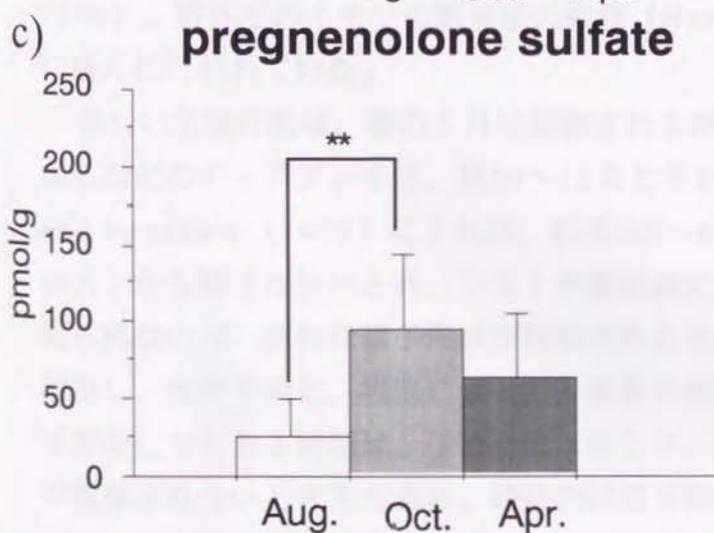
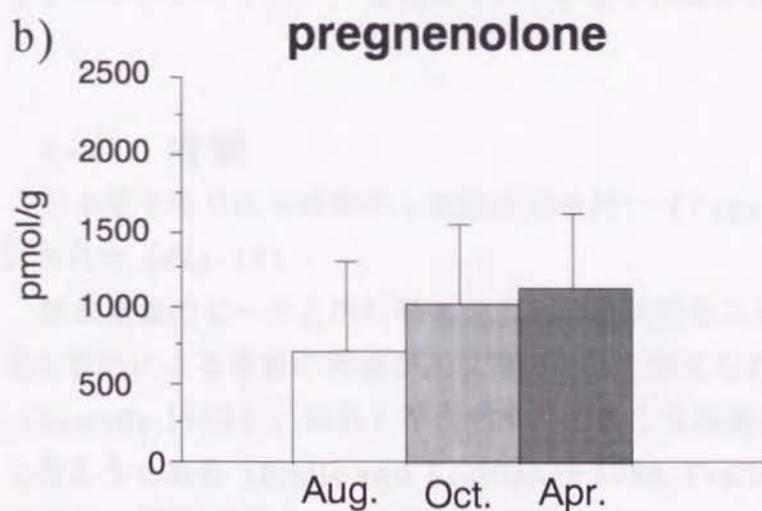
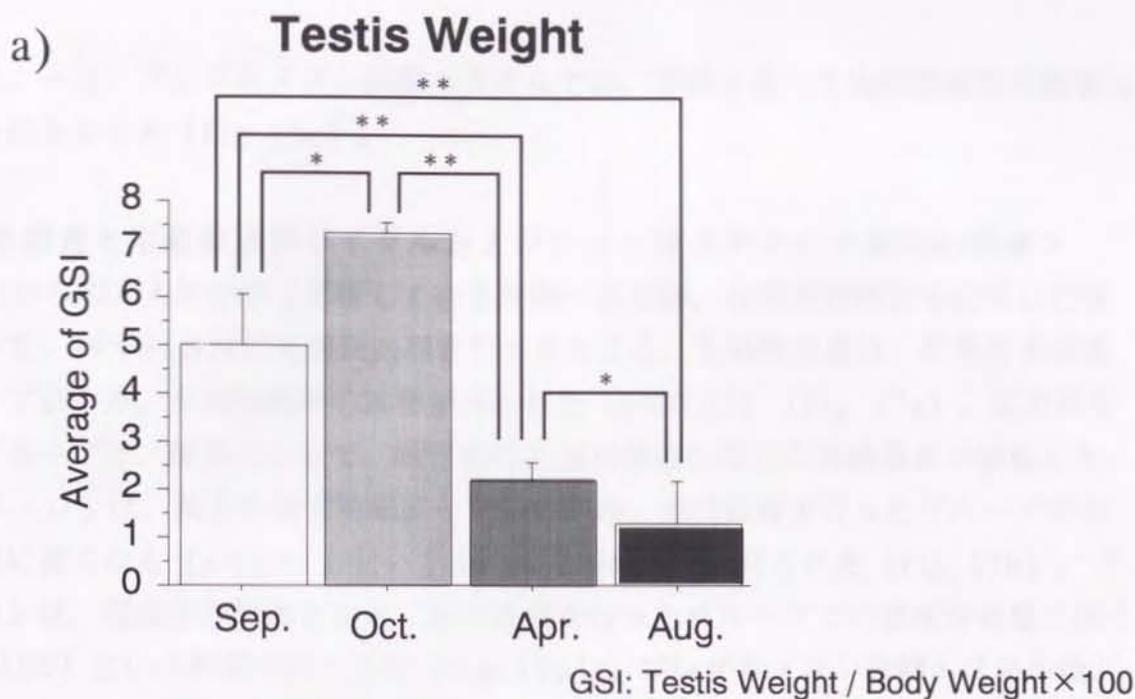


Fig.15 Seasonal change of testis weight and neurosteroids in the brain. One-way factorial ANOVA and multiple comparison tests * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

れなかった。一方、プレグネノロン硫酸エステルでは、季節を通じて光周期処理の顕著な影響は見られなかった (Fig. 16c)。

＜光受容器官と生殖腺成熟サイクルおよびニューロステロイド変化の関連＞

どの器官からの光入射が強く影響しているか調べるため、各光受容器官を破壊した個体群について、99年6-8月に光周期処理を行ったところ、生殖腺重量は、松果体を破壊したグループにのみ、光周期処理の影響が見られた ($p < 0.05$) (Fig. 17a)。松果体を破壊したグループで、眼球の有無で、短日処理と長日処理の間で生殖腺重量が逆転した。

プレグネノロンは、両方の器官を除去した場合のみ、長日処理を行ったグループでの濃度が有意に高くなる ($p < 0.01$) という光周期処理の影響が見られた (Fig. 17b)。プロゲステロンは、眼球のみ除去すると、長日処理を行ったグループでの濃度が有意に高くなる ($p < 0.05$) という影響が見られた (Fig. 17d)。プレグネノロン硫酸エステルは、手術の影響が見られず、光周期処理の影響が観察されなかった (Fig. 17c)。

4-4. 考察

日本産イモリは年周期的な繁殖周期を持つ (Tanaka and Iwasawa 1979) ことが、確認された (Fig. 14)。

精巣重量のピークと性行動の発現との時期的なズレが今回観られたことについて、精巣の放出による重量の軽減が主な理由として考えられる。奈良と静岡といった地域差 (Sawada 1963)、野外と準自然条件のような環境の違いによっても、時期にズレが生じるようである (Fraile and Rodriguez 1988, Fraile and Saez 1989, Paniagua et al. 1990)。野外でのイモリの繁殖期の観察 (Naruse 1993) においても、生殖行動は5月に盛んに行われていた。

著しい生殖行動は、春の5月に観察されるが、それ以外にも、雄が雌に対して尻尾を振るなどのディスプレイは、秋10~11月と冬1~2月にも観られた (第二章)。Tanaka and Iwasawa (1979) によれば、精巣は5~6月に最低値になるが、その頃の精巣は、シストから精子が放出され、シストが腺組織に変換される。7月には成熟精子がほとんど観られないが、活発な精子形成が観察されると報告されている。秋から冬には成熟精子が増加し、放精や消化、吸収によって、重量が減少していくようである。すなわち、成熟精子が少しでもある時期は、生殖行動は起こり、成熟精子がほとんど無い時期に、生殖行動が観察されないと考えられる。婚姻色は夏を除いて、程度の弱い発色は年中観られる

(Tanaka and Iwasawa 1979) が、春の繁殖期に最も強く、秋にも再び強く発色する。生殖行動はむしろ婚姻色の発色の程度と時期的に一致している。生殖行動は、婚姻色を制御するシステムとの関連の方が強いかもしれない。

Testis Weight

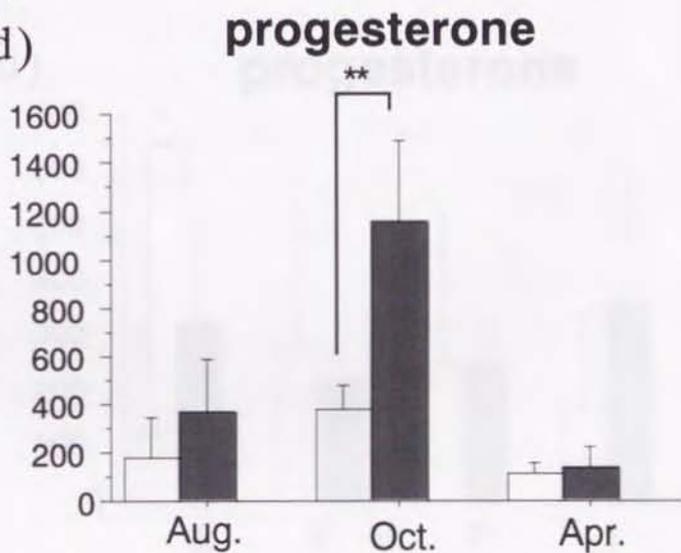
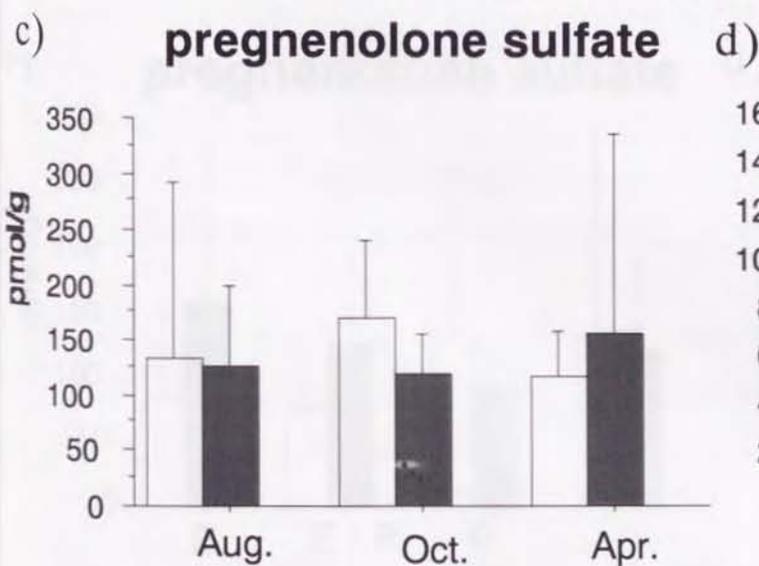
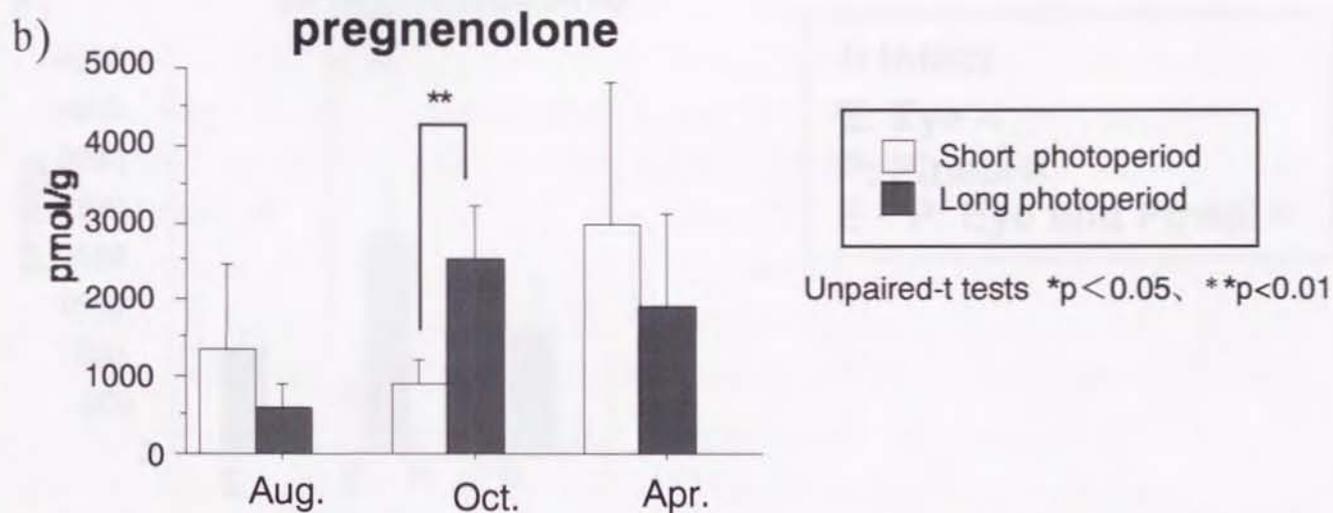
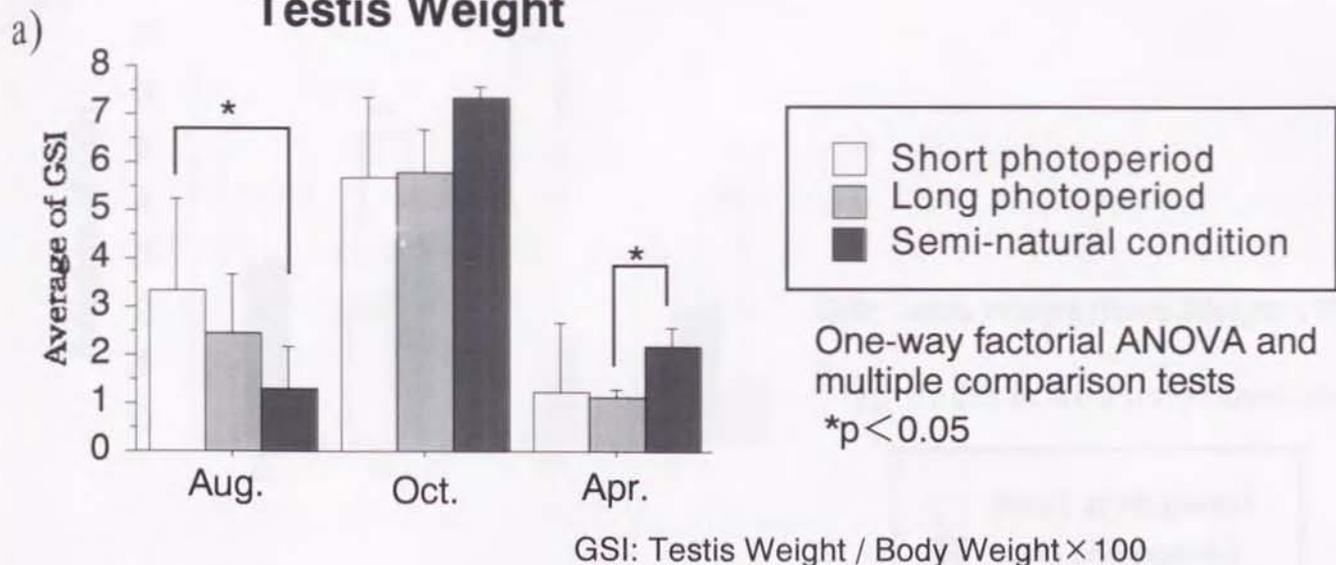


Fig. 16 Effects of photoperiods on the testis weight and the amount of neurosteroids in the brain.

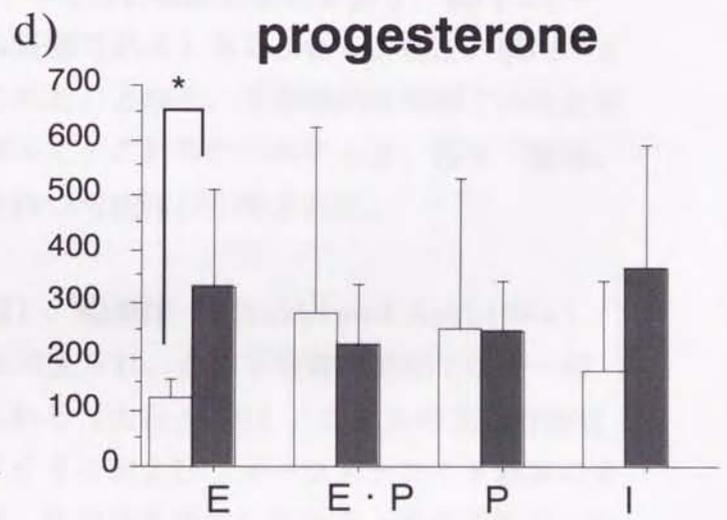
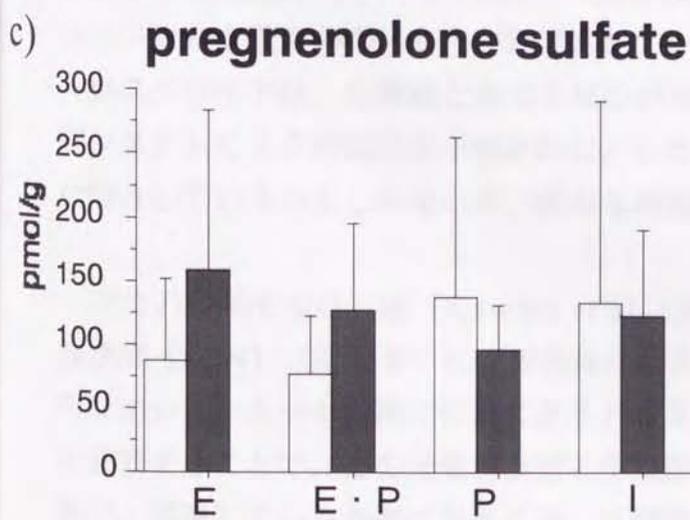
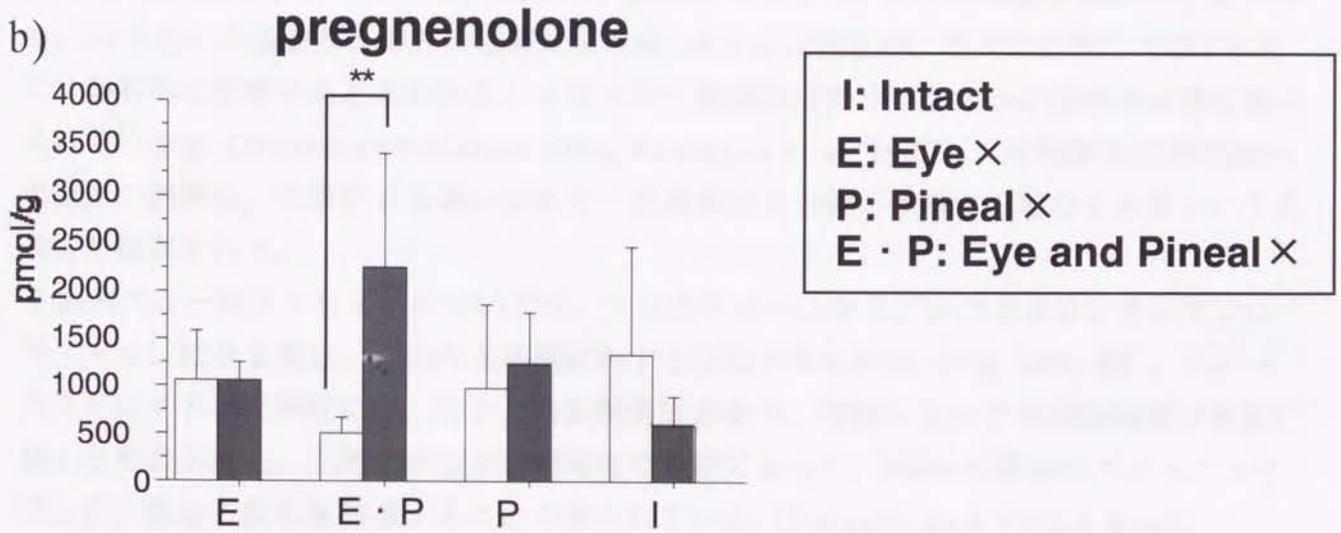
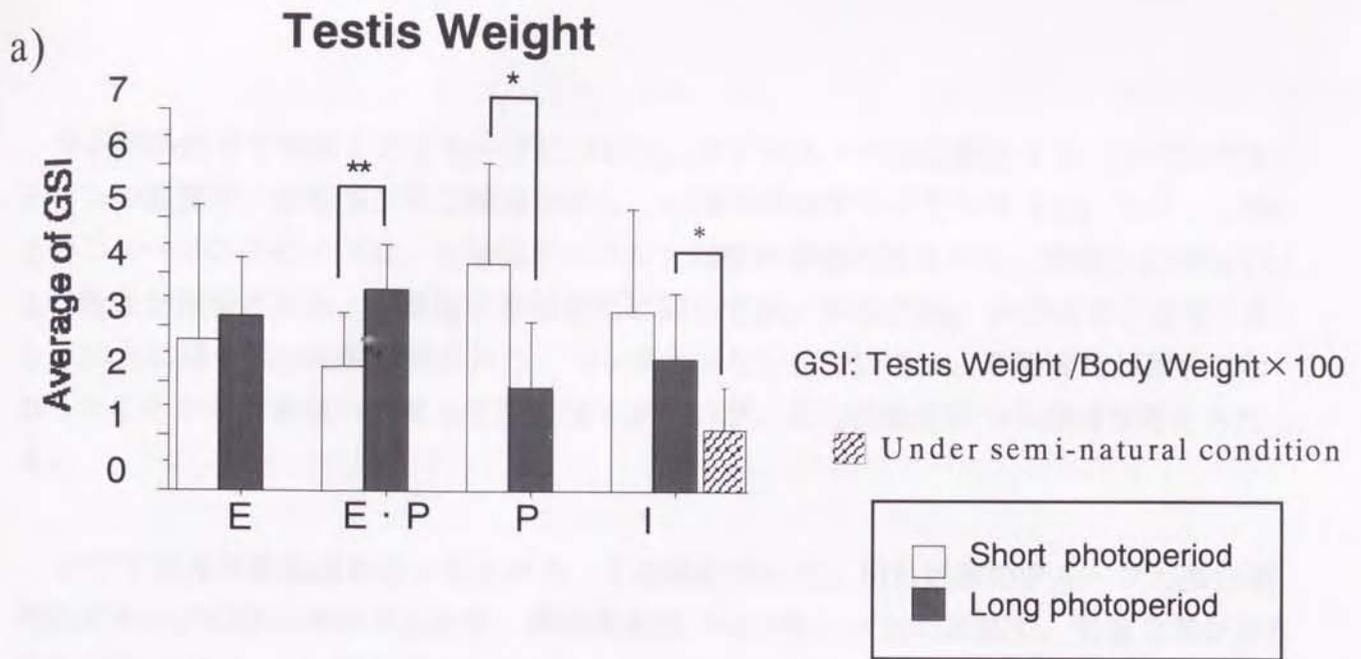


Fig. 17 Effects of eye \times , pineal \times , and eye and pineal \times on the testis weight and the amount of neurosteroids. Unpaired t-test ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$.

準自然条件下で飼育したグループにおいて、プレグネノロン硫酸エステルとプロゲステロンの濃度が、生殖腺と同じ傾向を示し、10月に増加することから (Fig. 15)、これらのニューロステロイドは、生殖腺サイクルと同様の季節変化を示し、繁殖に関与している可能性が示唆された。生殖腺の季節変化に関しては、本章のFig. 14の結果とほぼ一致し、10月に最も高い結果が見られた。プレグネノロンについては、季節変化が観られなかったことから、繁殖への関与を否定はできないが、別の機能を持つ可能性が考えられる。

25°C下で光周期処理を行ったところ、生殖腺について、短日処理のグループと長日処理のグループの間で差が見られず、準自然条件下のグループとの比較で、有意な差が見られた (Fig. 15a)。生殖腺重量の変動は、光周期ではなく、むしろ温度の影響が考えられる。25°Cという温度が、野外の温度により低い8月には促進的、野外の温度より高い4月には抑制的に影響すると思われる。イモリの生殖腺の成熟サイクルへの温度の影響は調べられているが (Benito and Marina 1988, Paniagua et al. 1990)、今回新たに生殖腺への温度の影響に、季節による違いがあり、光周期よりも強く作用する場合もあるという可能性が観察された。

脳内ニューロステロイドについては、コレステロールからプレグネノロンそしてプロゲステロンに至る系に、秋のみ光周期に対する反応が見られた (Fig. 15b, d)。ニューロステロイドの光周性に関しても、時期特異性があり、季節によって光周期刺激が有効に働くと考えられる。光周期刺激が環境温度や季節によって、*Rana*の眼球のメラトニンリズムに、異なる反応を誘導することが知られている (Delgado and Vivien-Roels 1989)。生殖腺サイクルと同様に、内因性のものを含む複数の要因により、脳内ニューロステロイド濃度の季節変化が調節されている証拠であると考えられる。また、脳内ニューロステロイドは、生殖腺と異なる反応が見られたことから、生殖腺の年周期と異なる制御システムによる可能性が示唆された。したがって、これらのシステムは、各々「繁殖」に関与しているかもしれないが、異なる機能を持つ可能性が示唆された。

アカハライモリは、眼 (Kawata et al. 1992)、松果体 (Kikuchi and Aoki 1984)、脳深部 (SCN) (第五章) に光受容体があると考えられ、かつ下等脊椎動物では、一般的にオシレーターも、同じ位置にあると考えられる (大石 1999)。これらの光受容器官を破壊することで、どの光受容器官と生殖腺サイクルおよびニューロステロイド濃度の変動が、関連しているか調べたところ、生殖腺は、松果体を除去したとき (松果体除去、松果体・眼球除去) のみ、光周期処理の影響が見られた (Fig. 16a)。松果体のあるグループ (眼球除去、無傷) には、光周期処理の影響は観られず、松果体が光周期に対し抑制的

に働いていると考えられる。松果体があるグループは、準自然条件のグループに対し、両方の光周期条件で重量が増加する傾向にあり、温度の影響が強く観られるが、松果体の無いグループは、準自然条件のグループに対し、光周期の影響が強く出た。このことから、温度を感知する機能があるとされる松果体 (Underwood 1990) が、生殖腺サイクルに関して、光周性に対する反応を抑制し、温度に対する反応を促進する機能を持つと考えられる。即ち、生殖腺成熟は、松果体と強い関連があると考えられる。この実験は8月に行われたが、生殖腺の光周期に対する影響は、他の季節でも観られないことから (Fig. 16)、必ずしもこの季節に限られないと予想される。季節によって、特定の温度に対する、松果体からのアウトプットが、促進的であるか抑制的であるか変化しているかもしれない。また、眼球と松果体の両方除去しても、光周期の影響が見られる ($p < 0.01$) ことから、脳深部光受容体の生殖腺への関与も示唆された。

松果体を除去したグループで、眼球の有無で光周期の影響の仕方が異なるのは、短日であるか長日であるかによって、眼球からのアウトプットが促進的か抑制的か変化すると解釈できる。マーブルイモリで網膜光受容と生殖腺成熟の関連は否定されている (Fraile and Rodriguez 1988, Fraile and Saez 1989)。今回有意な差が観られたことについて、種差や温度 (Paniagua et al. 1990) などの実験設定条件の違い、また季節の違いが考えられる。特に3ヵ月にわたる光周期処理は、生殖腺成熟の進行に対する抑制、促進効果を減少させるかもしれない。というのは、生殖腺の成熟は、成熟サイクルのどの時期に処理するかによって、その効果に違いがあり、サイクルの後期には、ほとんど効果が無くなるという報告がある (Goldman and Darrow 1983)。このように、生殖腺は、複数の器官から情報を受け取り、各々の器官が環境に従って、異なる情報をアウトプットしていると考えられる。

プレグネノロンは、両方の器官を除去したグループにのみ影響が見られ、脳深部光受容体からの調節である可能性が考えられる (Fig. 17b)。かつ、眼球、松果体の両方が抑制的に機能していると考えられる。プロゲステロンは、眼球のみ除去すると影響が見られることから、光周期反応に、松果体が促進的、眼球が抑制的に機能していると考えられる (Fig. 17d)。プレグネノロン硫酸エステルは、手術の影響が見られなかった (Fig. 17c)。また無傷の個体においても、季節を通じて光周期に影響を受けず (Fig. 16c)、季節変動が見られた (Fig. 15c) のは、光周期の直接の影響ではないと予想される。それぞれの脳内ニューロステロイドの変化は、異なる環境要因および関連器官に、制御されていることが明らかとなった。

以上の結果より、イモリのニューロステロイドは、濃度変化のピークが生殖腺重量と一致している (Fig. 15) ことから、繁殖に関与していると予想されるが、環境因子の影響の仕方の違いから、生殖腺サイクルとは別の系で調節されていると考えられる。情報

は、複数の器官から得られ、光周性反応に対し、促進的なアウトプットと抑制的なアウトプットがあると考えられる。促進的か抑制的かは、温度など他の要因、あるいは季節性によって変化すると予想される。複数の器官から情報を得たり、複数の制御システムにより脳内のニューロステロイドレベルがコントロールされることで、多様な環境情報や内因性の情報に対処していると考えられる。

ニューロステロイドについては、コレステロールからプレグネノロンそしてプロゲステロンに至る系が、光周期に影響を受けている (Fig. 16) と考えられるが、破壊実験結果 (Fig. 17) より制御機構は異なると考えられる。光周期の影響は観られないが、季節変動は観察されたことから、プレグネノロン硫酸エステルは、むしろ温度あるいは内因性のものの影響を受けていると考えられる。異なる調節を受けていることから、おそらくこれらの性ステロイドは、繁殖システムの中でも、異なる役割を請け負っていると予想される。

これらの物質の詳細な機能を知るには、さらに検討する必要があるが、哺乳類で、ニューロステロイドは、GABA受容体に作用し、シナプスの可塑性などに関与していると報告されている (Majewska and Schwartz 1987, Mienville and Vicini 1989, Concas et al. 1999, Tsutsui and Ukena 1999, 筒井 1999)。両生類の脳でもステロイドのGABA受容体への作用が報告されている (Orchinik et al. 1999)。アカハライモリのPON (視索前核)、SCN (視交叉上核) にP-450sccが発現していることが観察されている (Inai, personal communication) ことから、SCNやその周辺部でニューロステロイドが合成されていることが示唆される。SCNには、GABA細胞が多く存在し (Franzoni and Morino 1989)、性行動の中核である視床へ入力している (第五章)。従って、GABA受容体に作用することで、シナプスに影響して、特定の時期に性行動が発現する機能を制御している可能性が考えられる。

また、SCNに脳深部光受容体がある可能性が示唆されているが (第五章)、同じ器官でニューロステロイド合成細胞が見つかっており (Inai, personal communication)、かつ今回の破壊実験の結果 (Fig. 17) からその関連も示唆されている。SCNにはメラトニン受容体が多く存在する (Tavolaro et al. 1995) ので、メラトニンを介して、松果体や眼から影響を受けている可能性が予想される。

哺乳類でSCNでの光反応性は、セロトニンによって抑制されていると考えられている (Rea et al. 1994) が、イモリSCNにもセロトニンニューロンが多く存在する (Agustin and Wilhelmus 1991, Fasolo et al. 1986)。このような神経伝達物質の違いも、促進的な反応につながるか、抑制的な反応につながるかの違いの要因として、考えられる。

5. 光受容系とそこからの神経連絡

5-1. 序論

光受容部の特定と、その機能的解析を目的に、組織化学的検討を行った。下等脊椎動物の多くで、眼球、松果体、脳深部での光受容が報告されているが、イモリについても、眼、松果体および眼、松果体以外の光受容体の存在が示唆されている (Chiba et al. 1993)。そこで、視物質抗体による免疫染色で、光受容体の局在と、その受容体の性質も検討し、そこからの神経連絡および神経伝達物質の解析を行うことを目的に実験を行った。

イモリの網膜では、green rodが最も多く観察され、Rh-As (antiserum against toad and lamprey rhodopsin)による染色が観察されている (Kawata et al. 1992)。脊椎動物のほとんどの種において、網膜での光受容は確認されているが、さらに網膜に時計を持つ種も、脊椎動物全般に多く報告されている。アフリカツメカエル (Besharse and Iuvone 1983, Cahill and Besharse 1991, 1993, Green and Besharse 1994, Green et al. 1995, Hasegawa and Cahill 1997, 1998)、ヒキガエル (Korenbrod and Fernald 1989) で、網膜時計機構が報告されている。

イモリの網膜において、アセチルコリン、チロシン、グルタミン酸 (Sarthy and Lain 1983)、GABA (Sarthy and Lain 1983, Chiba et al. 1997)、ドーパミンやその合成に関与する酵素の生成が確認されている (Sarthy and Lam 1983)。ハトの網膜でドーパミン放出リズムが観られ、概日時計との関連が示唆された (Adachi et al. 1998)。アフリカツメカエルの網膜で、ドーパミンはメラトニンにより抑制されるため、フィードバックを介して振動体機構に関係があり (Adachi et al. 1998)、また主観的夜におけるリズムの位相変化に関与している (Cahill and Besharse 1991, Hasegawa and Cahill 1999) と言われている。しかしながら、イモリでは、網膜で生成された神経伝達物質の機能は解明されていない。

アカハライモリの視神経は、preoptic nucleusからnucleus of basal optic neuropilに終末端をのぼし、最終的にoptic tectumに入る (Fujisawa et al. 1981)。視床下部、脳下垂体など内分泌系への直接の投射は確認されていず、眼球破壊の実験による報告 (Benito et al. 1988, Paniagua et al. 1990) でも、網膜光受容と生殖腺との関連は否定されている。ただし、光周性はメラトニンを介して影響すると言われているが、*Rana*において、光周期に対する反応が眼球のメラトニンに影響を受けていると報告されている (Delgado and Vivien-Roels 1989) ので、必ずしも季節性との関連は否定できない。

イモリの松果体では、光受容体 (Kikuchi and Aoki 1982, 1984)、および振動体が存在するとされ、行動リズムの光同調機構に重要な役割を担うとされている (Chiba et al. 1993)。松果体での光受容機構は哺乳類を除く脊椎動物全般で報告されている。円口類 (Morita and Samejima 1984)、魚類 (Pickard and Tang 1993)、爬虫類 (Bolliet et al. 1997)、鳥類 (Deguchi 1979) で、松果体での電気活動やメラトニン分泌の概日変動が報告されているが、高等になるにつれ、概日機構がSCNに移行し、松果体の概日リズムとの関連が小さくなる (Cheung and McCormack 1982)。両生類では、松果体光感覚細胞においてメラトニン産生が示唆されている (Wiechmann 1986)。BufoとRanaの松果体にメラトニン分泌リズムの概日リズムが観られ (Serino et al. 1993, Delgado and Vivien-Roels 1989)、概日機構との関連が示唆されている。イモリについても、メラトニンを合成していることは、わかっている (Chiba, personal communication)。

一般的に松果体はSCNを介して生殖腺に作用し、その光受容は光周性に関与していると考えられている (Gozes et al. 1989, Shibata et al. 1989)。脊椎動物の松果体にはメラトニンの合成制御機構があり、SCNや下垂体、メラノフォアのメラトニン受容体に作用し、概日リズムや季節変化さらに両生類では体色変化にも関与していると言われる。

哺乳類を除く脊椎動物一般で、眼、松果体の他に、脳深部に光受容体が存在することが報告されている (Yoshikawa and Oishi 1998)。カエルでもSCNで光受容物質の所在 (Foster et al. 1994, Yoshikawa et al. 1994, Provencio et al. 1998) と、間脳での光受容が報告されている (Dodt and Jacobson 1963)。ヒキカエルでは、脳深部よりヒキカエルピノブシンがクローニングされている (Yoshikawa et al. 1998)。しかしながら、有尾両生類では、未だ光受容体の所在が明らかにされていない。

SCNは哺乳類でよく研究されており、概日時計機構に重要な役割を果たすとされている (Klein et al. 1991)。アフリカツメカエルで振動体の存在が示唆されている (Harada et al. 1998)。イモリの脳に振動体があることは破壊実験から予想されているが (Chiba and Aoki 1993)、場所は特定されておらず、SCNの機能も全く解明されていない。

イモリのSCNで、アセチルコリンエステラーゼ (Eagleson et al. 1998)、GABA (Franzoni and Morino 1989)、メラトニンレセプター (Tavolaro et al. 1995)、セロトニン (Gonzalez and Smeets 1991, Fasolo et al. 1986) の存在が免疫染色で報告されている。これらの物質および受容体は、振動体、光同調機能に関与するとされている。アセチルコリンは哺乳類のSCNで主観的夜での位相前進に関与していることが報告されている (Martha 1997) が、まだ受容体は見つかっていない。メラトニンを受容しており、メラトニンに制御を受けていることから、他の振動体から影響を受けながら機能している可能性も予想される。

本章では、組織化学的手法で光受容器官の特定、および振動体の位置の推定、神経連絡からその機能的解析を行い、第2～4章で行ってきた実験の結果について、さらに考察を深めた。

5-2. 材料と方法

<材料>

業者（浜松生物教材株式会社、静岡）から購入した雌の成体アカハライモリ *Cynops pyrrhogaster*。

<光受容部の同定>

免疫染色法を用いた。

眼、松果体、脳を取りだし、4% paraformaldehyde in PBにより固定した。抗体は、光受容細胞の特定には、Rh-As (antiserum against toad rhodopsin (anti-toad Rh supplied by Okano)) を用いた。

解剖後、4%パラフォルムアルデヒドにより固定し、サッカロース溶液 (10%～30% in PB) で固定液を洗い、OCT compound (Sakura finetek USA Inc. Torrance, CA 90504 USA) で包埋した。クリオスタットで、パラレルセクション (20—40 μ m) を作成し、ABC法により染色を行った；PBS (phosphate buffer saline: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.35g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 26.85g, NaCl 71.5g, NaN_3 8.75g, D.W. 8.75l) で洗い、1% H_2O_2 in Methanol で内因性ペルオキシダーゼを抑えた。また、内因性のアビジンやビオチンに対する反応を抑えるため、BLOCKING KIT (biotin/avidin system, Vector, USA) を並行して用いた。ABC KIT (VECTASTAIN Elite ABC Mouse IgG KIT, Vector, USA) による方法により、抗体は全てヤギ血清で希釈した。ビオチン化二次抗体を反応させ、アビジン-ビオチン化ワサビペルオキシダーゼ複合体の酵素活性を利用して、DAB solution (diaminobenzidine: 3-3'-ジアミノベンチジン四塩酸塩 50mg, D.W. 40ml, tris buffer 60ml, 0.3% H_2O_2 1ml) で、発色させた。

対照実験として、マウス正常血清を一次抗体のかわりに反応させた。水洗後、アルコール、キシロール系列で脱水、透徹し、HSR(ミドリ十字、神戸)で封入した。

観察には、透過型光学顕微鏡 OLYMPUS BHS (オリンパス光学工業株式会社、東京) を用い、撮影には顕微鏡撮影装置 OLYMPUS PM-10M (オリンパス光学工業株式会社、東京) を用いた。

<神経連絡の観察>

§ トレーサー法

イモリの頭蓋骨を開け、松果体部分のみ脳膜を剥がし、メスで切り込みを入れた後、バイオサイチン (ϵ -Biotinoyl-L-Lysine, SIGMA, USA) の結晶を乗せた。また、頭部をSCN部分で切断し、SCNが露出した断面に、同様に結晶を乗せた。その際、Vaseline (White) でSCN部分以外を覆って、漏れを出来るだけ防いだ。このようにして、30分間放置して松果体、SCNにバイオサイチンを取り込ませ、リンガーで洗い流した。約5°C下リンガー溶液中で、酸素を供給しながら、約18時間インキュベートした。その後、10%ホルマリンで固定し、OCPコンパウンドに包埋して、クリオスタットで40 μ mセクションを作成した。ABCキットを用いて、アビジン-ビオチン化ワサビペルオキシダーゼ複合体の酵素活性を利用して、DAB solutionで発色させた。確認のため、同様の方法を3回繰り返した。

コントロールとして、松果体部分の脳膜を破らず、そのまま上にバイオサイチンを乗せ、同様の処理を行い比較した。

観察には、透過型光学顕微鏡LEITZ DMR (ライカ株式会社、東京)、撮影には、自動撮影装置ライカMPS60 (ライカ株式会社、東京) を用いた。

§ 鍍銀染色～石川変法～

上記と同様にイモリの脳を取りだし、10%ホルマリンで固定し、アルコールで脱水後、パラフィンで包埋した。パラフィンセクション (10 μ m) を、frontalとsagitalで作成した。よく乾燥させた後、アルコール・キシロール系列を経て、脱水脱パラを行った。水洗した後、プロテイン銀溶液に37°Cで、約26時間反応させた。DWで洗浄後、還元液である0.5%塩化金酸水溶液、2%シュウ酸水溶液、5%チオ硫酸ナトリウムに反応させた。水洗してからアルコール・キシロール系列を経て脱水、透徹し、HSRで封入した。

観察には、透過型光学顕微鏡OLYMPUS BHS (オリンパス株式会社、東京) およびLEITZ DMR (ライカ株式会社、東京)、撮影には、顕微鏡撮影装置OLYMPUS PM-10M (オリンパス株式会社、東京) および自動撮影装置ライカMPS60 (ライカ株式会社、東京) を用いた。

5-3. 結果

<光受容器官の所在>

第三脳室周辺、視床下部の視交叉上核SCNで、Rh-Asにより、一部の細胞群に免疫反

応が観察された。主に、脳室から2層目の細胞の細胞膜と一部の線維に、反応が観られた (Fig. 18)。

脳地図は、Donkelaar (1998) のThe Central Nervous System of Vertebrates Vol. 2を参考にした。

<光受容器官とそこからの神経連絡>

網膜、松果体で光受容されていることは今までに知られていたが、さらに上記の実験で脳SCNで光を受容している可能性が示唆された。そこで、今回、光受容機能の知られている松果体、およびRh-Asによる免疫染色が観られたSCNにバイオサイチンを注入した (Fig. 19)。局所注入ではなく、器官全体に結晶を乗せるという方法を用いたため、Rh-Asで免疫反応の出た細胞以外にもバイオサイチンが入っているが、今回は器官レベルで解析した。

松果体からは、松果体神経束が、第三脳室周辺を左右二手に分かれ、下方後方に走り、Tegmentum mesencephaliを通り、脊髄に入っていた (Fig. 21-24)。また、神経線維は、下方に放射状に伸び、後方に入り、視葉との連絡が観察された。他への終末端は観察されず、視床下部や、脳下垂体などへの投射も観察されなかった。また、SCNとの連絡も観察されなかった。

SCNからは、脳室に垂直に外側へ伸びる神経が主に観察された (Fig. 25, 26)。左右にも短い線維を伸ばしている細胞が観察され、周辺の細胞と連絡していることが観られた。SCN背側では、ななめ上方と上方の視床に伸び、SCN腹側では下方にも伸びていた。後方にも線維を伸ばしており、視床下部と連絡があることが示唆される。

視葉から逆に注入して、そこからの神経連絡を観察すると、脊髄や大脳など様々な領域に投射していたが、松果体への逆の連絡も観察され、松果体と視葉の連絡が確認された。また、視床への投射が観察された (Fig. 25-28)。

5-4. 考察

イモリの脳深部では、光受容は否定されていた (Ingeborg et al. 1980)。しかし今回の実験で、最新の免疫染色キットと東大深田研究室との共同で作成されたヒキカエル網膜ロドプシン抗血清を用いた免疫組織化学的手法により、他の脊椎動物と同様に、第三脳室周辺部視床下部の視交叉上核SCNでのRh-Asでの免疫反応が観られた。網膜、松果体に加え、脳深部SCNでも光を受容している可能性が示唆された。網膜、松果体以外での光受容は、破壊実験による行動リズムの結果から報告されている (Chiba et al. 1993)。今回の実験で、それが脳深部SCNにある可能性が示唆された。

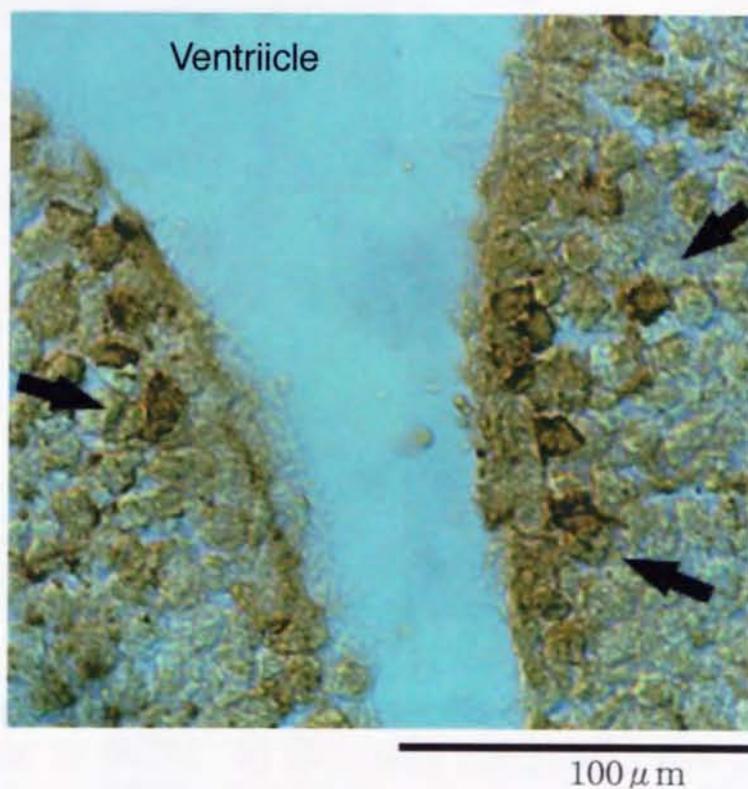
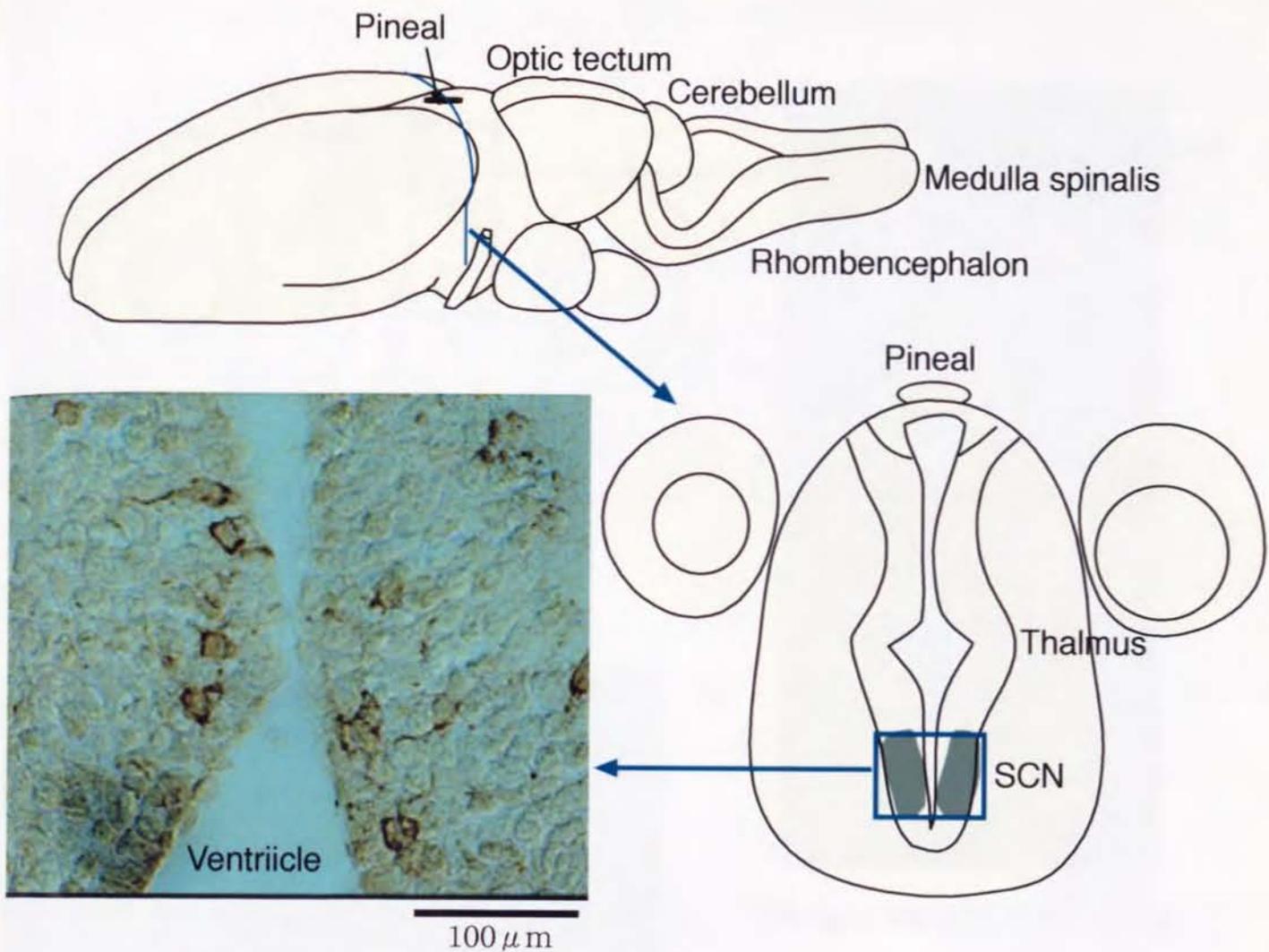


Fig. 18 Rh-As immuno-reactive cells in SCN.

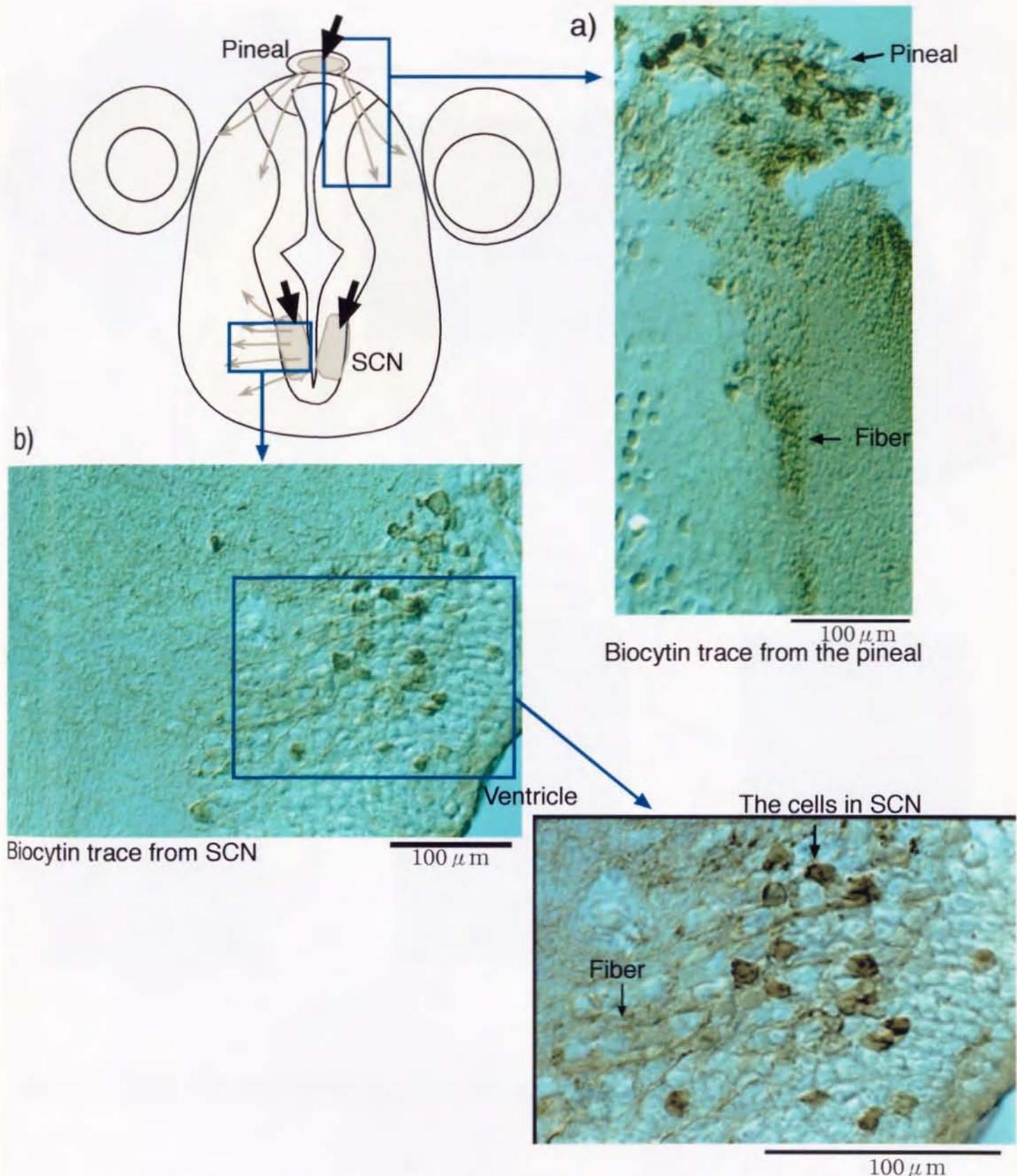


Fig. 19 The developed color area of neuro fibers when we injected biocytin into pineal or SCN. a) Biocytin trace into the pineal. b) Biocytin trace into SCN. Bold black arrows show the injection area.

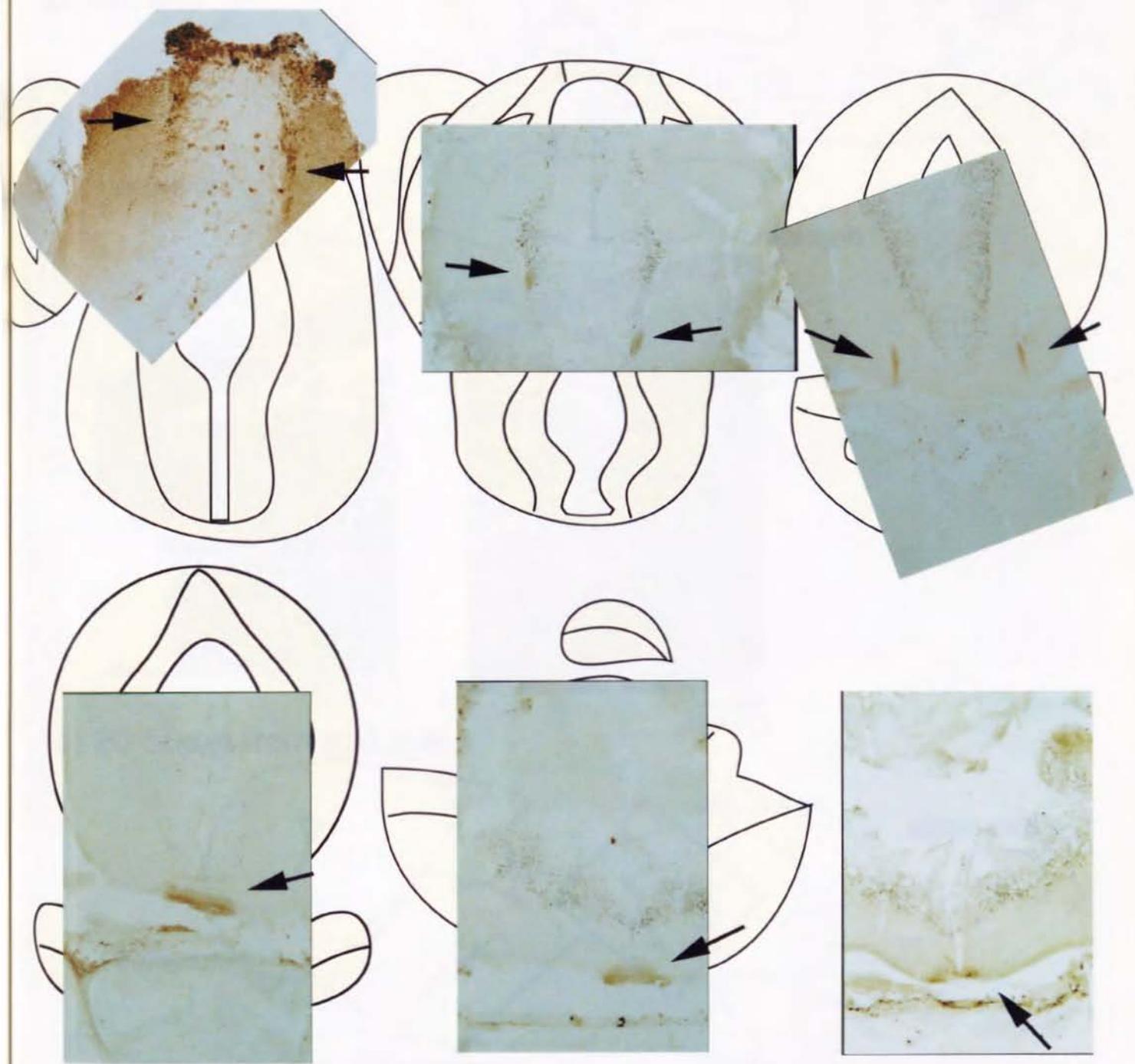
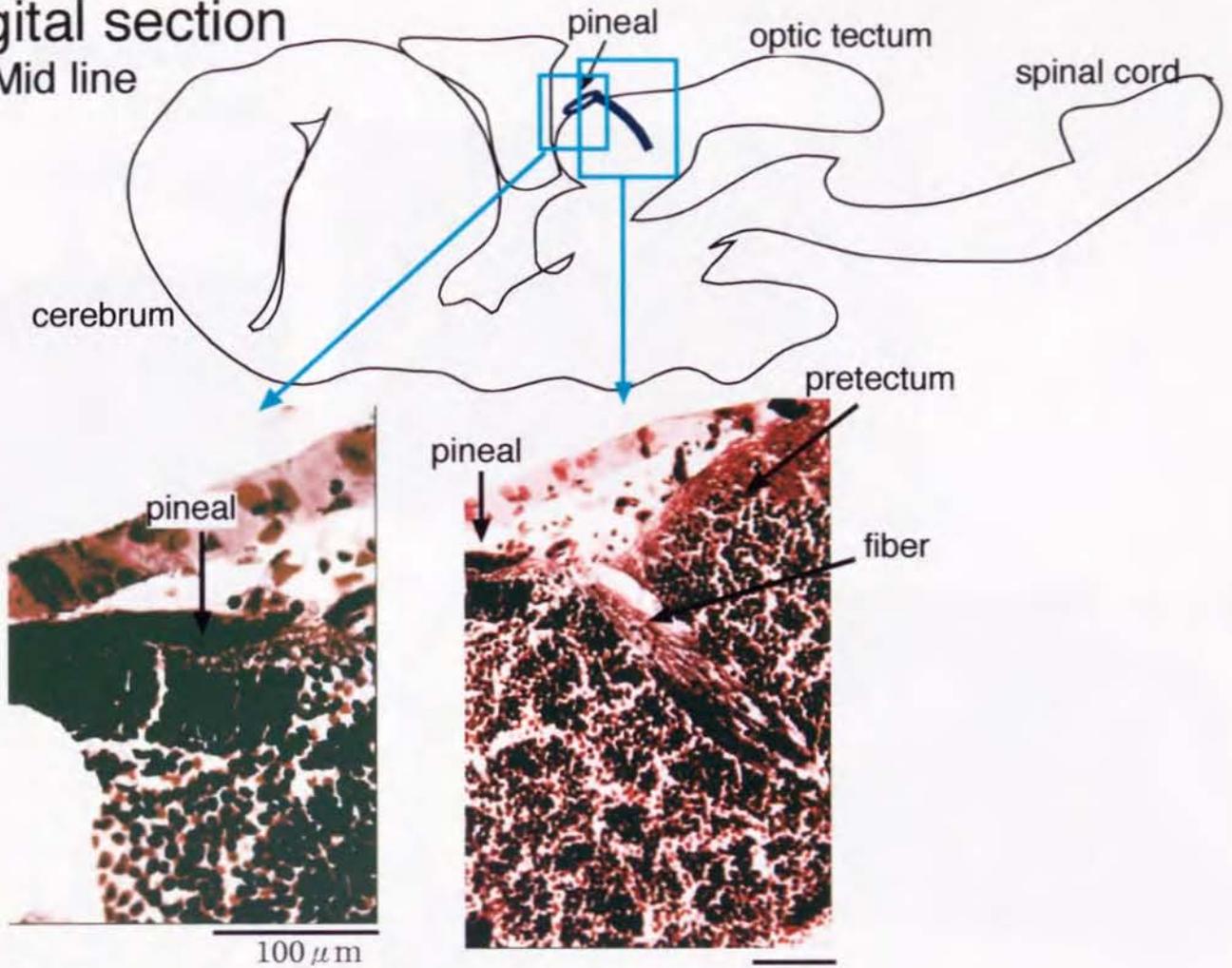


Fig. 20 The developed color areas of tracer from the pineal.

Sagittal section

a) Mid line



b) 20-50 μm from mid line

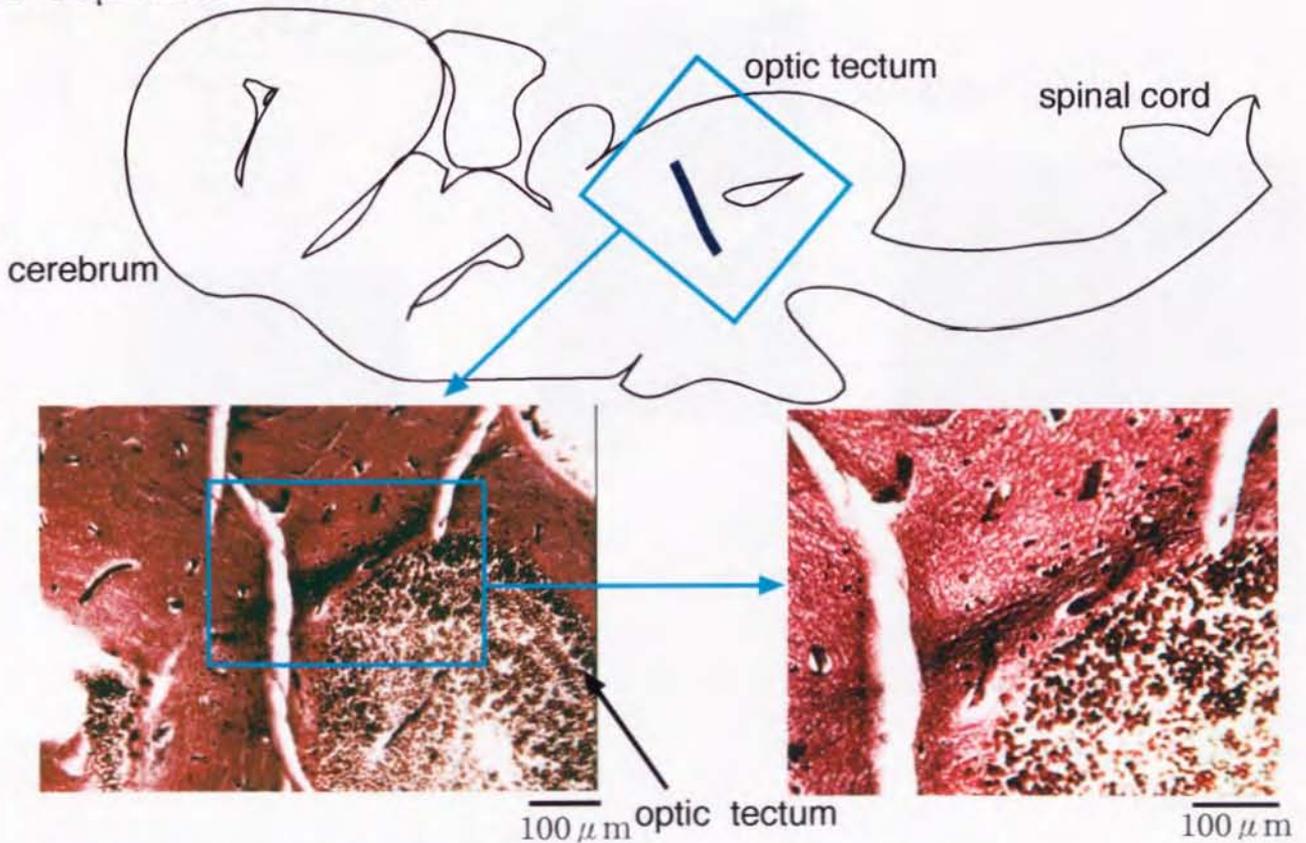


Fig. 21 The pineal and pineal tract by silver staining.

cross section

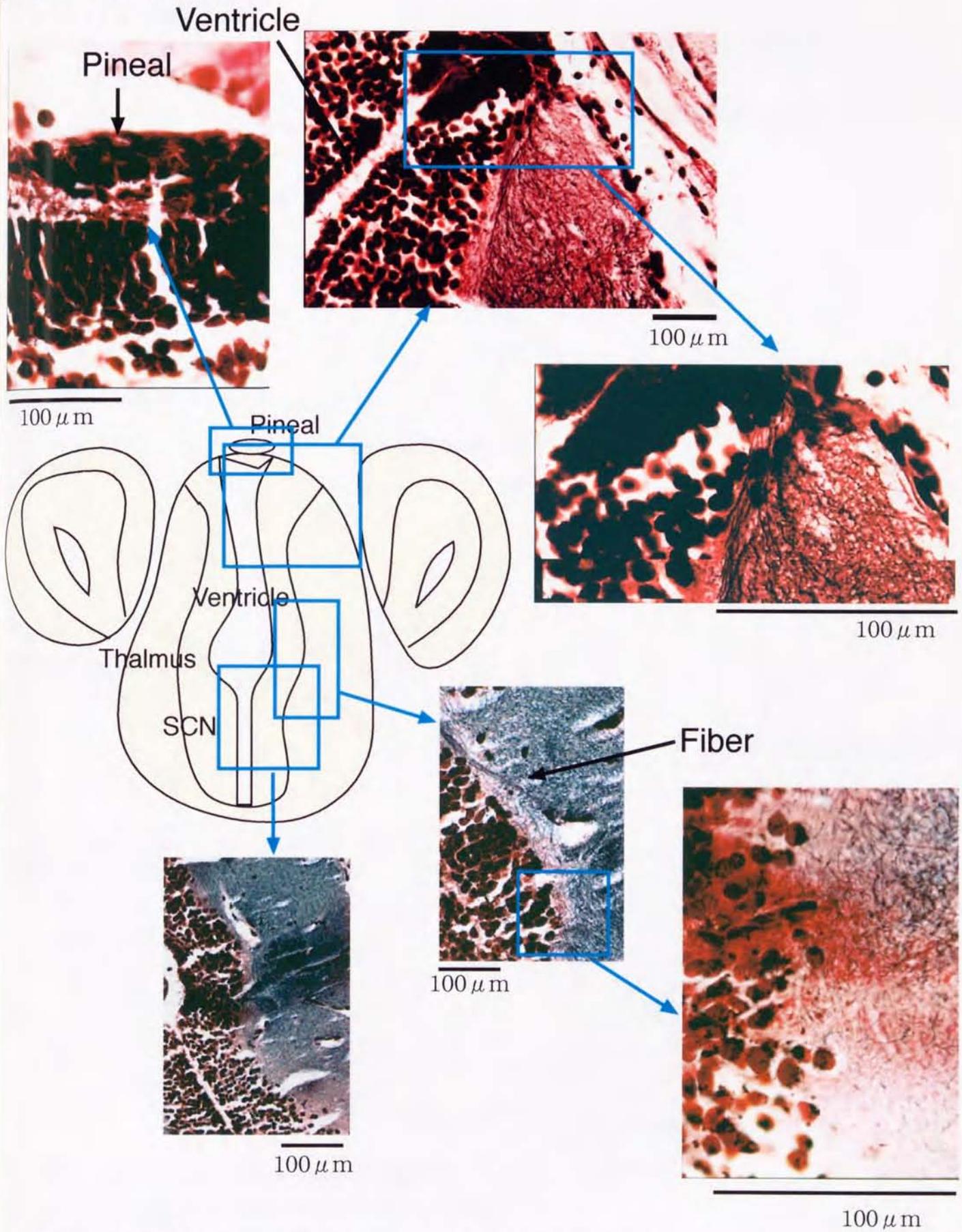


Fig. 22 Third ventricle arroundby silver staining.

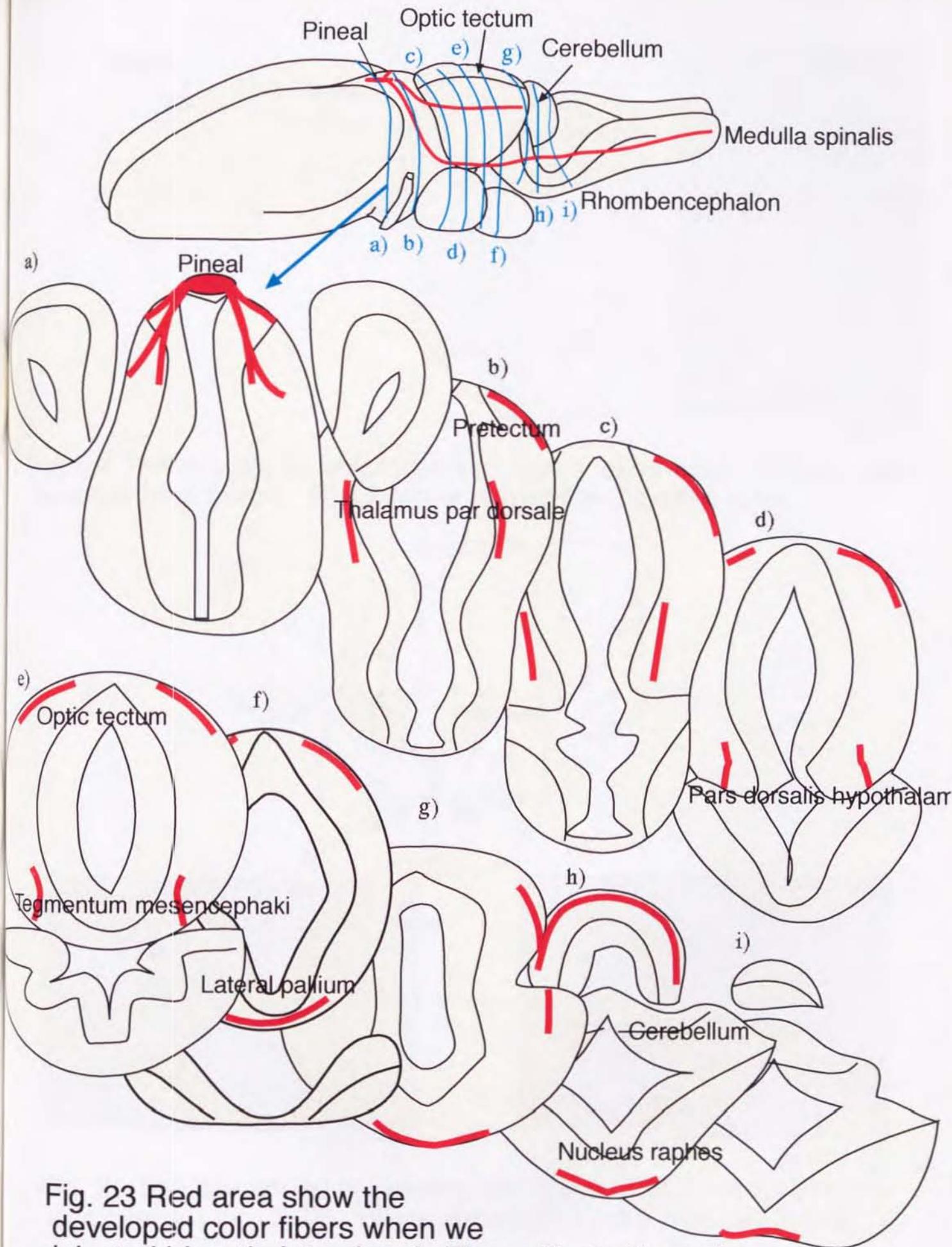


Fig. 23 Red area show the developed color fibers when we injected biocytin into pineal. These illustrations show the neural network from pineal. Blue alphabets correspond black alphabets.

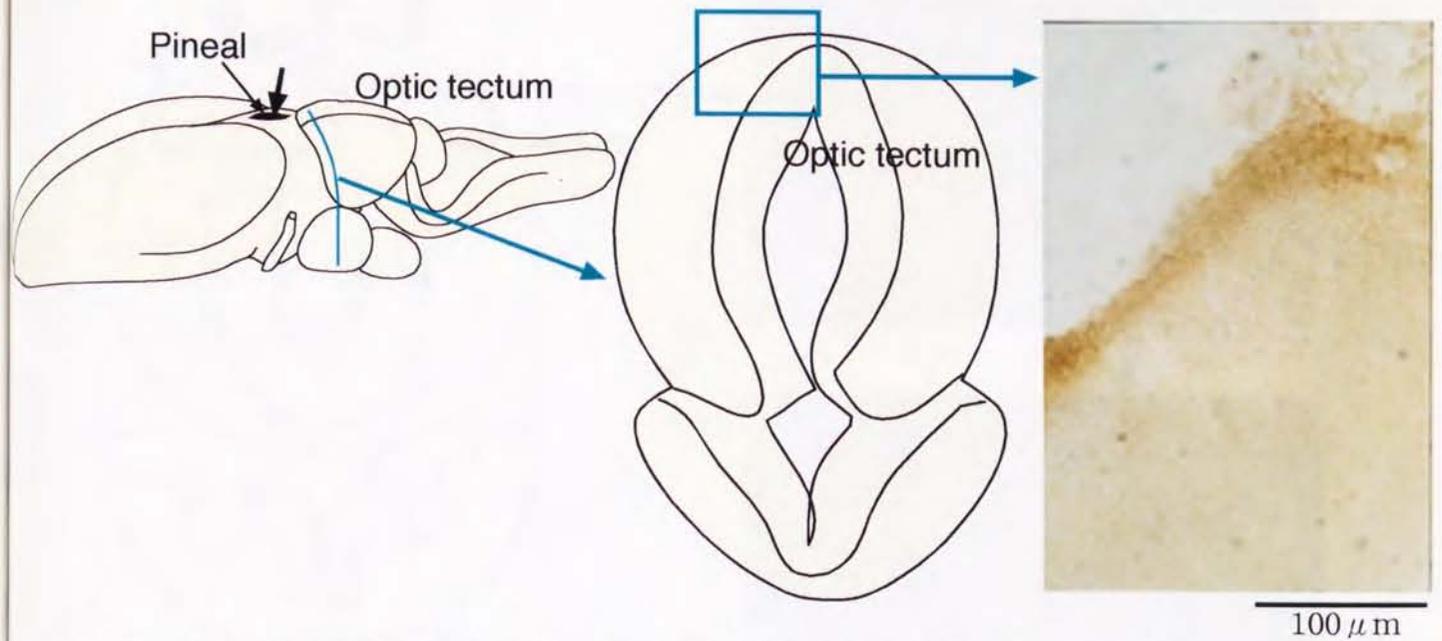


Fig. 24 The developed color fibers of optic tectum when biocytin was injected from pineal. Black arrow shows the injection area.

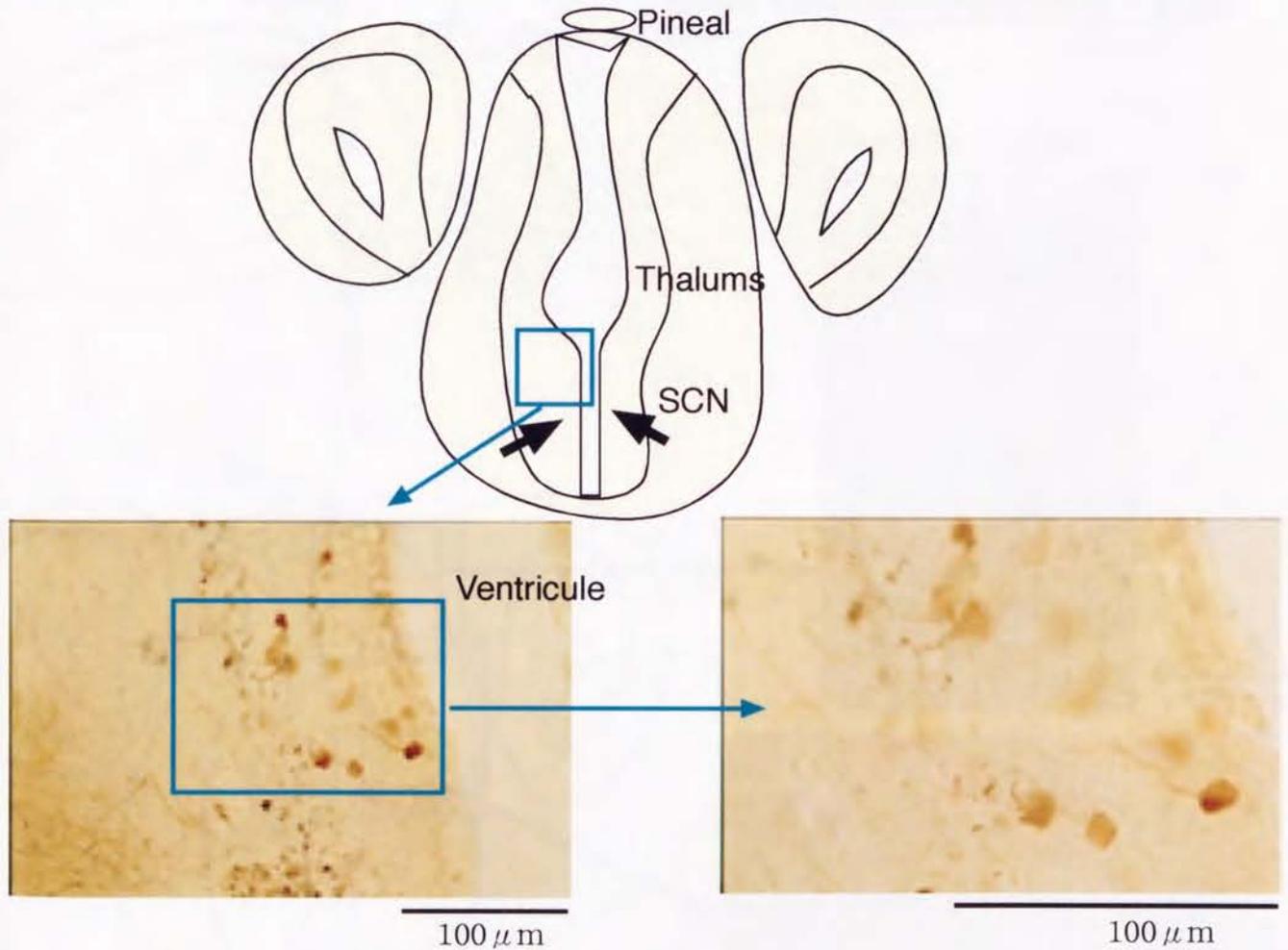


Fig. 25 The developed color cells and fibers of SCN when biocytin was injected into SCN. Black arrows show the injection areas.

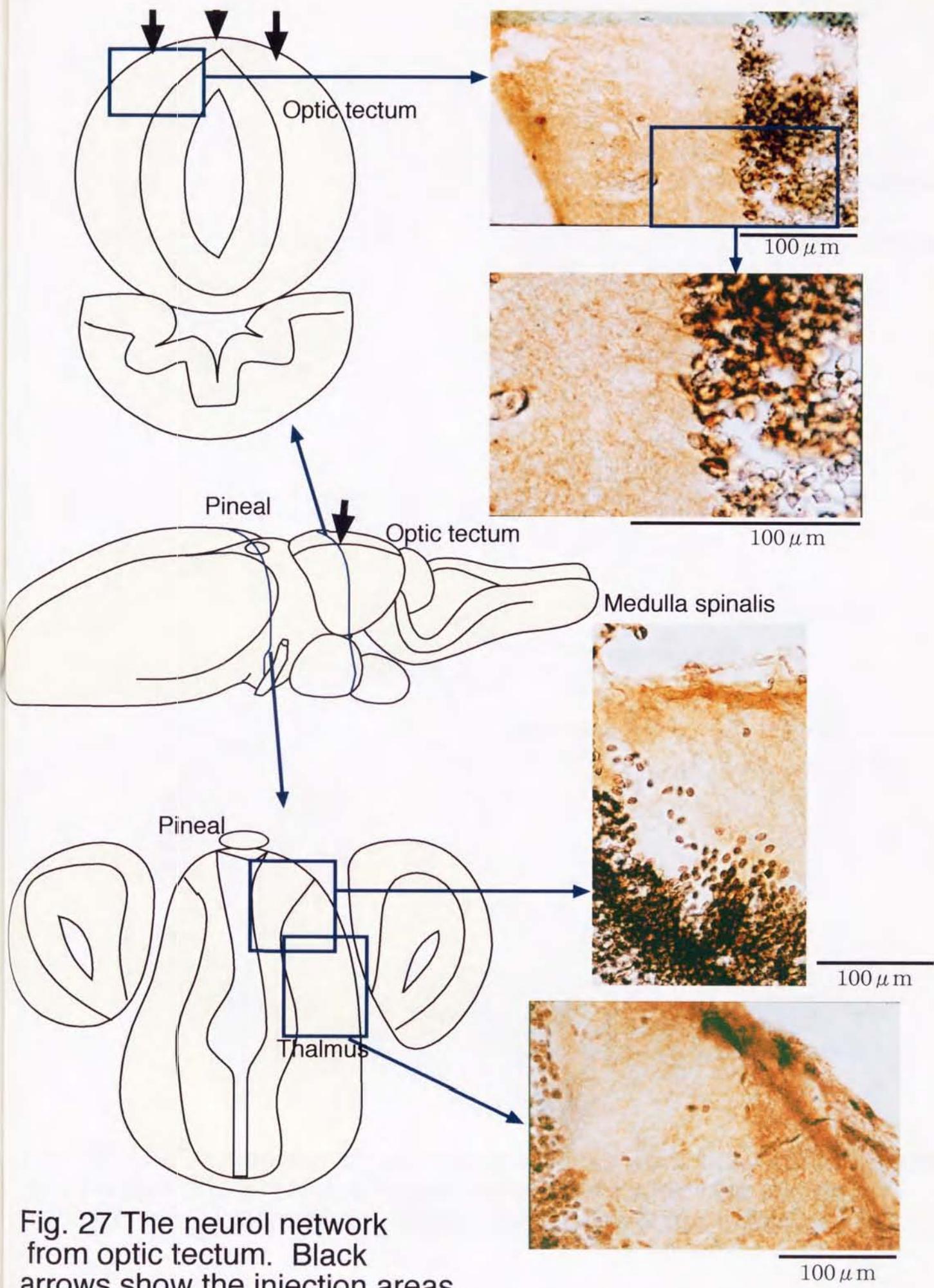


Fig. 27 The neural network from optic tectum. Black arrows show the injection areas.

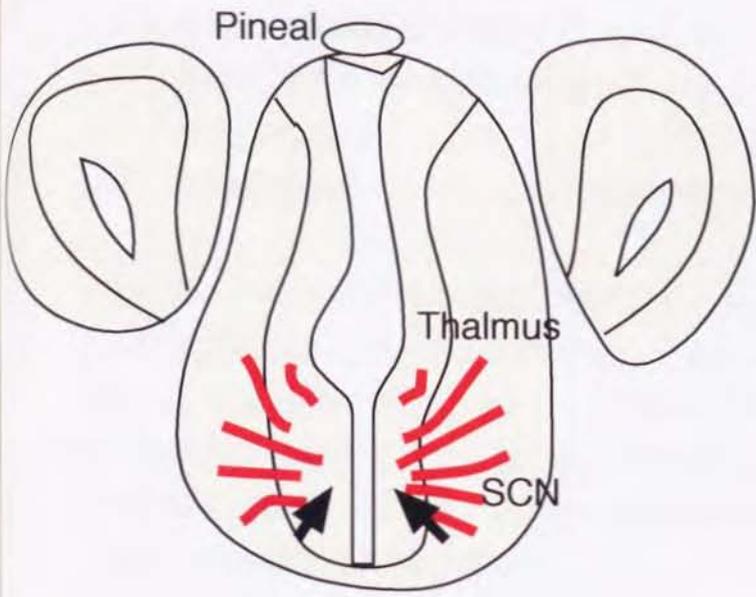


Fig. 26 The illustration shows the neural network from SCN. Red areas show the developed color fibers when we injected biocytin into SCN. Black arrows show the injection area.

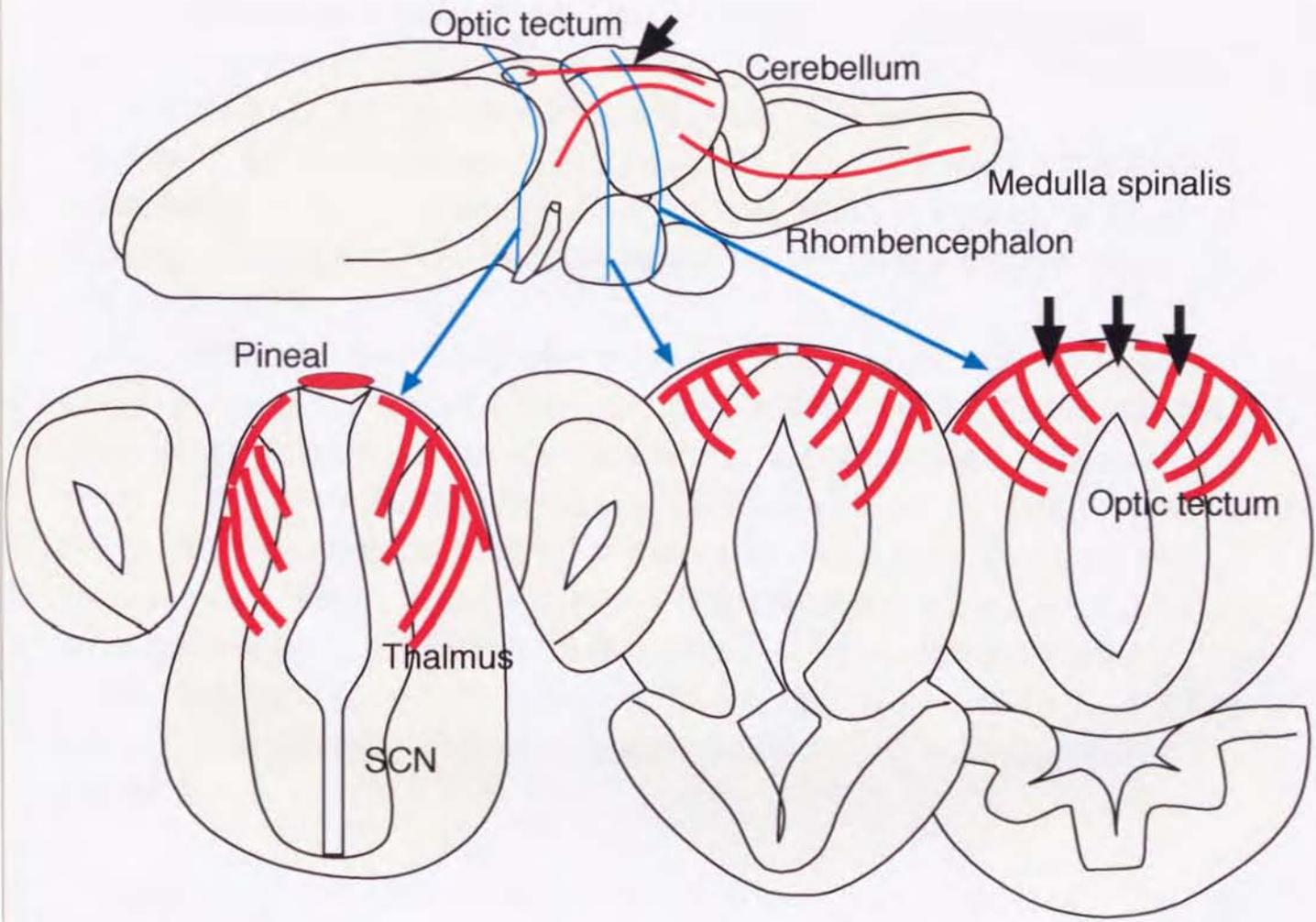


Fig. 28 The illustration shows the neural network from Optic tectum. Red areas show the developed color fibers when we injected biocytin into optic tectum. Black arrows show the injection area.

松果体での光受容は既に論証されていたが、今回の実験で、ロドプシンを外節に持つことが示された。イモリの松果体外節には、 α トランスデューシンが存在することが、わかっており (Veen et al. 1986)、ロドプシンの活性から α トランスデューシンの系を介して、光情報が伝達されている可能性が示唆された。

さらに、その光受容体の機能を解析するため、そこから伸びる神経連絡を観察した。

下等脊椎動物は、光受容器官にオシレーターも存在すると言われているが (大石 1999)、この動物に関しては、眼、松果体、脳深部 (SCN) に光受容体を持ち、同時に眼、松果体に振動体を持つ。脳に振動体があるとすれば、SCNにあると予想される。今回の実験での観察では、眼、松果体、SCNの間に神経による直接の連絡は観察されず、これらの振動体間の直接の神経によるカップリングは無いと考えられる。液性連絡か、間接的な連絡によるものと考えられる。

視神経は視床とBON (basal optic nucleus) に投射しているが (Fujisawa et al. 1981)、視神経が視床に投射しているのは、下等脊椎動物の一般的な形態である。しかし、それ以外の投射については、種間差が大きい (Donkelaar 1998)。下等脊椎動物では、大脳ではなく、視床に統合機能があると言われる (佐藤 1996)。

松果体からも視葉との連絡が観られた (Fig. 21-24, 28)。したがって、眼球網膜と、松果体の情報は、視葉で統合されていると考えられる。網膜と松果体には、両方ともに光受容機能と振動体を持つ。したがって、光情報のみならず、振動体情報の両方が、そこで統合されているかもしれない。

カエルで松果体とSCNの連絡は観察されているが (Gozes et al. 1989)、イモリ *Cynops pyrrhogaster* についても観察したところ、松果体からの視床やSCN、他の視床下部部分への投射は確認されなかった。両生類では、松果体は内分泌との関連が示唆されている。しかしイモリでは内分泌系への直接の連絡が観られなかった。生殖腺の光周性反応への、眼球除去の影響は観られないという報告がある (Fraile and Rodriguez 1988, Fraile and Saez 1989)。直接の内分泌系への投射は観られなかったことから正しいかもしれない。第四章でも、眼球除去の影響は観られなかったが、松果体おを破壊したグループで、眼球の有無で、光周性への反応の仕方に違いが観られた。したがって、支配的であると予想される松果体も同時に破壊した場合、眼球からのメラトニンなどが影響する可能性がある。

SCNからその周辺部への連絡が観察されたことについて (Fig. 22, 25, 26)、視床、視床下部との連絡が観察され、脳深部光受容体と内分泌系の関連が示唆された。

SCNでは、ニューロステロイド合成酵素が発現しており (Inai, personal communication)、脳内ニューロステロイドは、繁殖期に高くなるという季節変動を示

す（第四章）。したがって、これらニューロステロイドの季節変化に脳深部光受容体が関与している可能性が示唆された。また、内分泌系との連絡からも、繁殖期との関連が示唆される。

視床へは、視葉からの投射も確認されており、間接的に網膜や松果体との連絡が確認された。また、第四章の結果について、SCNでのニューロステロイド合成は、視葉と視床を介して、他の光受容器官からの調節を受けていると考えられる。

さらに、POA (Inai, personal communication) でもニューロステロイド合成酵素が発現しているが、網膜からの直接の影響も考えられる。

このように、網膜、松果体からは、視葉を介した視床—視床下部の内分泌系への連絡、および脳深部光受容体からは、SCNでのニューロステロイド合成細胞との直接の連絡が示唆された (Fig. 29)。

したがって、破壊実験で、説明された複数の光受容器官からの情報による制御は、視葉と視床を介して行われると考えられる。



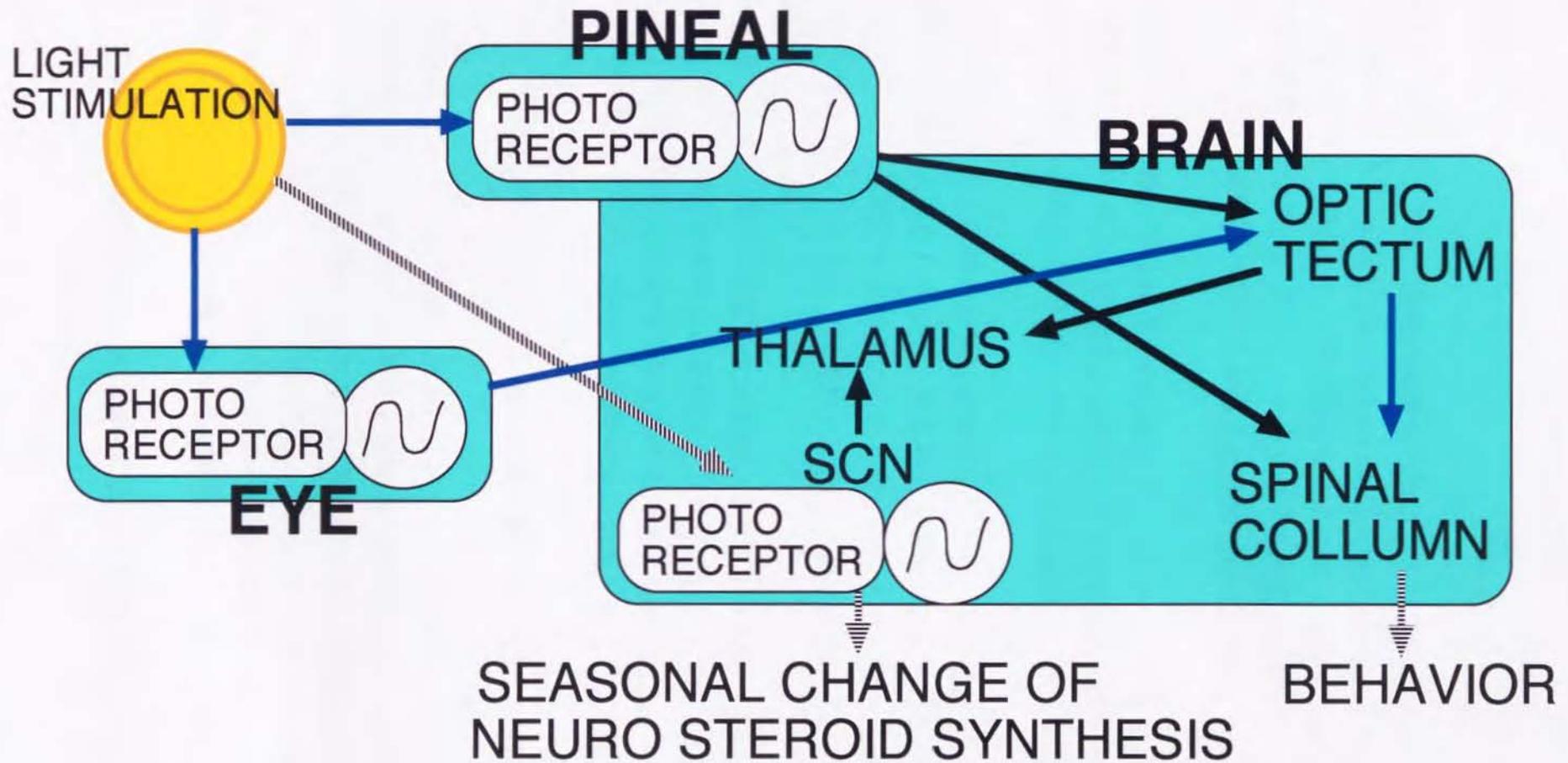


Fig. 29 Main process from retina and pineal that have photoreceptors, SCN that reactive to Rh-As. Broken lines mean the estimates. Blue lines mean already known knowledges. Black lines mean new suggestions.

6. 総論

従来アカハライモリでは、複数の振動体と複数の光受容器官が存在することが示唆されていた (Kikuchi and Aoki 1984, Chiba et al. 1993, Chiba and Aoki 1993)。今回の実験で、第三章のフリーランニング周期の検討の結果、第四章の破壊実験の結果、および第五章の免疫組織化学的検討により、イモリの「光受容—振動体」系は「多光受容体—多振動体」システムで説明できることがさらに明確となった (Fig. 30a, b)。

準自然条件下での概日行動リズムの記録から、昼夜行性が逆転する季節変化が観察された。行動内容によって異なる季節性と日周期リズムを示すことから、行動内容の変化が、概日リズムの変動を誘導する要因の一つであることが示された (第二章)。

行動内容ごとにリズム形成の性質を解析したところ、各行動によって影響しやすい環境因子が異なり、かつ選択される環境、即ち適した環境が異なることが観察された (第三章)。したがって、環境の変化が起こると行動内容の変化が起こるが、それには、例えば上陸活動が夜間に行われるという日周期レベルと、初夏に増加するという年周期レベルの変化がある。

また、行動ごとに、環境の影響の仕方の違いに加え、フリーランニング周期が異なる場合があることから、各行動が異なる振動体とカップリングしている可能性が考えられた。したがって、環境の変化が行動内容や生理状態の変化を導くとき、それらと各振動体はカップリングしているため、同時に働く振動体の種類も変化すると考えられる。

行動内容の変化は、繁殖期での性行動の発現に観られるように、内因性の変化による誘因も考えられる。

第四章の結果から、生殖腺重量とニューロステロイド濃度に、繁殖期に高くなるという季節変化が観察され、ニューロステロイドが繁殖に関与していることが示唆された。両生類で性行動の中枢とされる視床と、ニューロステロイド合成細胞のあるSCNが連絡していることから (第五章)、イモリについても、ニューロステロイドは性行動の発現に影響、あるいは誘因していることが考えられる。生殖腺サイクルとニューロステロイドが行動リズムの内因性の要因として働いている可能性が示唆された (第四章)。

第四章での破壊実験の結果から、破壊器官によって結果に違いが生じることから、各光

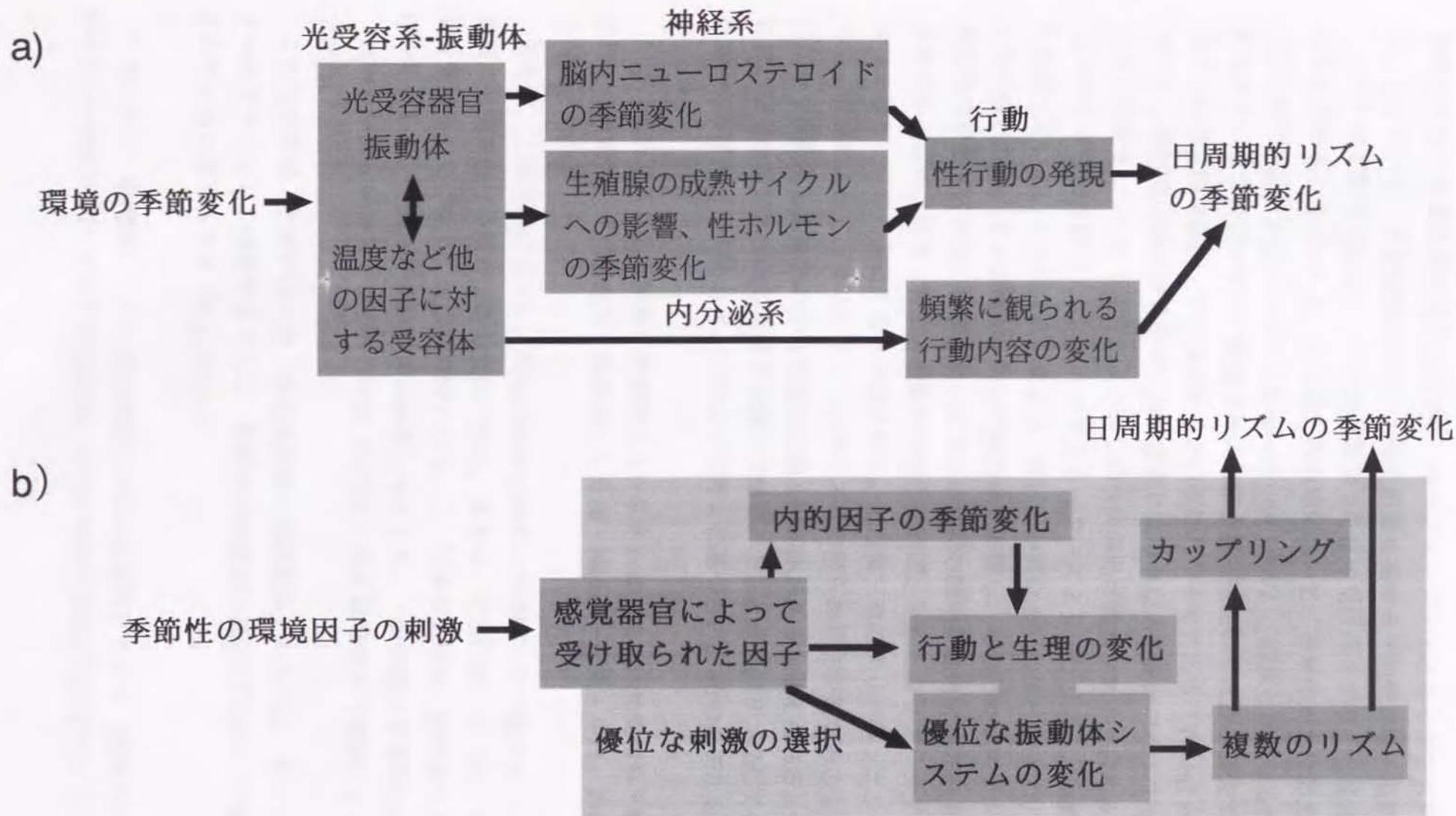


Fig. 30 概日リズムの季節変化を誘導するシステム。a)環境の変化から、光受容系-振動体系を介して日周期的行動リズムの季節変化へ至る今回わかった経路。b)環境の変化から、「多光受容体-多振動体」システムを介して日周期的行動リズムの変化が起こる仕組みについての考察。

受容器官により受け取る情報が異なり、かつアウトプットされる情報も異なると考えられる。したがって、環境の変化により、強く影響を受ける「光受容系—振動体」システムと、それほど影響されない、あるいは異なる影響の受け方をする「光受容系—振動体」システムがあると考えられる。それは、爬虫類において、松果体が光に加え温度の影響も受けて位相が決定されることから (Underwood 1990)、網膜とは異なる情報処理が行われており、かつ特定の器官を破壊することにより、特定のリズムが消失することから、器官ごとに自立的な振動システムがあるということからも言える (Tosini and Menaker 1998)。第四章の破壊実験結果より、器官により異なる情報がアウトプットされることから、イモリについても器官により自立的な情報処理機構があると言える。また、千葉等 (1993) が破壊実験により、マルチオシレーターにより這行リズムが制御されていることを示している。さらに、第二章より、各行動が異なる振動体とカップリングしていることが示唆された。ある環境が、特定の振動体に影響し、それとカップリングしている特定の生理や行動リズムの位相の変動、あるいは活動の開始を誘発する可能性が考えられる。すなわち、前述と逆で、特定の振動体が増加すれば、それとカップリングしている行動および生理も、同時に増加すると予想される。また第三章のフリーランニングリズムの記録から、環境によって、フリーランニングリズムの得られ易さが異なることから、環境にしたがって複数ある振動体のうちの優位に働く振動体があると考えられる。行動内容の変化には、特定の振動体がある環境下で優位に働き、それとカップリングしている行動は周期性を示しやすいと予測される。このような考えに基づき Fig. 30 のモデルを提唱した。

今回、概日リズムの季節変化を誘因するシステムとして、「光受容系・振動体—行動・生理」の経路と、「光受容系・振動体—内分泌・神経系—行動・生理」の経路を、提示した (Fig. 30a)。

前者は、上陸活動のように、照度や温度と関係して増加したり減少したりし、環境から直接の影響を受ける傾向のある変化である。後者は、生殖活動のように、環境の直接の影響を受けるのではなく、内因性の因子を介して、行動の発現や生理的变化が起こる。後者の中枢として、「SCN—視床」系が重要と考えられ、「脳深部光受容系—振動系 (SCN) —ニューロステロイド合成系 (SCN) —性行動発信系 (視床)」の連絡が示唆できた。

これらの系が、上記で述べた「多光受容体—多振動体」システム、即ちマルチオシレーターシステムとして機能することで、多様な環境変化に適応的に個体の行動や生理が制御されていると考えられる (Fig. 30b)。

このように、年周期システムと日周期システムは関連しており、環境や生殖腺の年周期的変化が行動の日周リズムを変化させ、また日周期の変化が年周期的なサイクルを持つこ

とが明らかとなった。

この仕組がマルチオシレーター（多振動体）システムで説明されるとすれば、その意義として、一つは、複数の振動体を持ち、各々が異なる行動、生理とカップリングすることで、性質の異なる行動や生理をより適応的に環境に同調させることができるということが考えられる。例えば水温の日周期サイクルと照度の日周期サイクルはピークが異なるが、呼吸は水温に、上陸活動は照度に相関する場合、各々の振動体を持つ方が適応しやすいと考えられる。二つ目は、年周期的な環境変化に対応するためであることが、示唆できた。環境により異なる振動体が働くことで、その季節の環境により適応した概日リズムを作り上げていると考えられる。

魚類でも、眼、松果体に光受容機能と時計を持ち (Iigo et al. 1997)、行動内容によって異なるリズムの位相を持つことが観察されている (Senchez-Vzquez et al. 1996)。爬虫類も同様に複数振動体を持ち、破壊する器官により消失するリズムが異なる (Tosini and Menaker 1998)。このような複数振動体による制御、即ちマルチオシレーターシステムは提唱されてきたが、イモリにおいても同様のシステムが機能していることが確認できた。したがって、多光受容体-多振動体システムが、哺乳類以外の脊椎動物における一般的モデルとなりえることを示すことが出来た。さらに、本研究では、両生類のように、水中、陸上という多様な環境に生息する場合、環境への適応におけるマルチオシレーターシステムの新たな機能とメカニズムを、神経、行動レベルで明らかにした。

7. 文献

- Adachi A, Suzuki Y, Nogi T, Ebihara S (1998) The relationship between ocular melatonin and dopamine rhythms in the pigeon: effects of melatonin inhibition on dopamine release. *Brain Res*
- Adler K (1970) The role of extraoptic photoreceptors in Amphibian rhythms and orientation: A review. *J. herpetology* vol.4: 99-112
- Aschoff J (1979) Circadian rhythms: influences of internal and external factors on the period measured in constant conditions. *Z Tierpsychol* 49: 225-249
- Aschoff J and Tokura H (1986) Circadian activity rhythms in Squirrel monkeys: Entrainment by temperature cycles. *J. Biol. Rhythms* 2: 91-99
- Besharse JC and Iuvone PM (1983) Circadian clock in *Xenopus* eye controlling retinal serotonin N-acetyltransferase. *Nature* 305: 133-135
- Bolliet V, Bogay V, Ravault JP, Ali MA, Collin JP, Falcon J (1994) Multiple circadian oscillators in the photosensitive pike pineal gland: a study using organ and cell culture. *J Pineal Res* 16: 77-84
- Bolliet V, Ali MA, Lapointe FJ, Falcon J (1996) Rhythmic melatonin secretion in different teleost species: an in vitro study. *J Comp Physiol (B)* 165: 677-683
- Bolliet V, Begay V, Taragnat C, Ravault JP, Collin JP, Falcon J (1997) Photoreceptor cells of the pike pineal organ as cellular circadian oscillators. *Eur J Neurosci* 9: 643-653
- Cadusseau J and Galand G (1981) Electrophysiological recordings of an extraocular and extrapineal photoreception in the frog encephalon. *Brain Research* 219: 439-444
- Cahill GM and Besharse JC (1990) Circadian regulation of melatonin in the retina of *Xenopus laevis*: Limitation by serotonin availability. *J Neurochem* 54: 716-719
- Cahill GM and Besharse JC (1991) Resetting the circadian clock in cultured *Xenopus* eyecups: regulation of retinal melatonin rhythms by light and D2 dopamine receptors. *J Neurosci* 11: 2959-2971
- Cahill GM and Besharse JC (1993) Circadian clock function localized in *Xenopus* retinal photoreceptors. *Neuron* 10: 573-577

- Cheung PW and McCormack CE (1982) Failure of pinealectomy or melatonin to alter circadian activity rhythm of the rat. *Am J Physiol* 242: 261-264
- Chiba A and Aoki K (1987) Relationship between daily variation of locomotor activity and that of plasma corticosterone levels in the newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Zool. Sci* 4: 543-549
- Chiba A and Aoki K (1989) Effects of diencephalic roof covering on the locomotor activity rhythm in the newt. *Jpn. J. Biometer.* 26(1): 15-27
- Chiba A, Kikuchi M, and Aoki K (1993) The effects of pinealectomy and blinding on the circadian locomotor activity rhythm in the Japanese newt, *Cynopus pyrrhogaster*. *J Comp Physiol* A172: 683-691
- Chiba A, Kikuchi M, and Aoki K (1995) Entrainment of the circadian locomotor activity rhythm in the Japanese newt by melatonin injections. *J Comp Physiol* A176: 473-477
- Chiba C, Matsushima O, Muneoka Y, Saito T (1997) Time course of appearance of GABA and GABA receptors during retinal regeneration in the adult newt. *Developmental Brain Res* 98: 204-210
- 千葉喜彦 (1996) からだの中の夜と昼-時間生物学による新しい昼夜観 中公新書
- Concas A, Follesa P, Barbaccia ML, Purdy RH, Biggio G (1999) Physiological modulation of GABA(A) receptor plasticity by progesterone metabolites. *Eur J Pharmacol* 375: 225-235
- Czopek J (1959) Skin and lung capillaries in European common newts. *Copeia* 2: 91-96
- Davis GA and Moore FL (1996) Neuroanatomical distribution of androgen and estrogen receptor-immunoreactive cells in the brain of the male roughskin newt. *J Comp Neurol* 372: 294-308
- Deguchi T (1979) A circadian oscillator in cultured cells of chicken pineal gland. *Nature* 282: 91-96
- Delgado MJ and Vivien-Roels B (1989) Effect of environmental temperature and photoperiod on the melatonin levels in the pineal, lateral eye, and plasma of the frog, *Rana perezi*: Importance of ocular melatonin. *Gen Com Endocrinol* 75: 46-53
- Doty E and Jacobson M (1963) Photosensitivity of a localized region of the frog diencephalon. *J Neurophysiol* 26: 752-758
- Do-Rego JL, Mensah-Nyagan AG, Feuilloley M, Ferrara P, Pelletier G, Vaudry H (1998) The endozepine triakontatetrapeptide diazepam-binding inhibitor[17-50] stimulates neurosteroid biosynthesis in the frog hypothalamus. *Neuroscience* 83: 555-570
- Dolmen D (1983a) Diel rhythms and microhabitat preference of the newts *Triturus vulgaris* and *T. cristatus* at the northern border of their distribution area. *J Herpetol* 17: 23-31
- Dolmen D (1983b) Diel rhythms of *Triturus vulgaris* (L.) and *T. cristatus* (Laurenti) (Amphibia) in

central Norway. *Gunneria* 42: 1-37

Donkelaar HJT(1998) The Central Nervous System of Vertebrates Vol. 2 Ed. by R. Nieuwenhuys, HJ Ten Donkelaar and C Nicholson, Springer-Verlag, Berlin

Eagleson GW, Ubink R, Jenks BG, Roubos EW (1998) Forebrain differentiation and axonogenesis in amphibians: . Differentiation of the suprachiasmatic nucleus in relation to background adaptation behavior. *Brain Behav Evol* 52: 23-36

Erkert HG and Thiemann A (1983) Dark switch in the entrainment of circadian activity rhythms in night monkeys, *Aotus Trivirgatus humboldti*. *Comp Biochem Physiol* 74: 307-310

Erkinaro E (1961) The seasonal change of the activity of *Microtus Agrestis*. *OIKOS* 12: 157-163

Eskin A (1971) Some properties of the system controlling the circadian activity rhythm of sparrows. In "Biochronometry" Ed by M Menaker, Academic Press, Washinton, DC. pp55-80

Falcon J, Bolliet V, Collin JP (1996) Partial characterization of serotonin N-acetyltransferases from northern pike (*Esox lucius*, L.) pineal organ and retina: effects of temperature. *Pflugers Arch* 432: 386-393

Fasolo A, Franzoni MF, Gaudino G, Steinbusch HWM (1986) The organization of serotonin-immunoreactive neuronal systems in the brain of the crested newt, *Triturus cristatus carnifex* Laur.. *Cell Tissue Res* 243: 239-247

Flight WF, Mans D, Balemans MG (1983) Methoxyindole synthesis in the retina of the frog (*Rana esculenta*) during a diurnal period. *J Neural Transm* 58: 3-4

Fraile B and Rodriguez MC (1988) Long day photoperiod and temperature of 20C induce spermatogenesis in blinded and non-blinded marbled newts during the period of testicular quiescence. *Biol Reprod*

Fraile B and Saez FJ (1989) Effect of photoperiod on testicular function in blinded and non-blinded newts, *Triturus marmoratus*. *J Morphol*

Franzoni MF and Morino P (1989) The distribution of GABA-like-immunoreactive neurons in the brain of the newt, *Triturus cristatus carnifex*, and the green frog, *Rana esculenta*. *Cell Tissue Res* 255: 155-166

Fujisawa H, Waranabe K, Tani N, Ibata Y (1981) Retinotopic analysis of fiber pathways in amphibian. . The adult newt *Cynops pyrrhogaster*. *Brain Res* 206: 9-20

深田吉孝、真野弘明 (1999) 概日リズムと松果体の光受容分子 生体の科学 50(3): 221-7

- Garnier DH (1985a) Androgen and estrogen levels in the plasma of *Pleurodeles waltl*, Michah., during the annual cycle. 1. Male cycle. *Gen Comp Endocrinol* 58(3): 376-385
- Garnier DH (1985b) Androgen and estrogen levels in the plasma of *Pleurodeles waltl*, Michah., during the annual cycle. 2. female cycle. *Gen Comp Endocrinol* 60(3): 414-418
- Gonzalez A and Smeets WJAJ (1991) Comparative analysis of dopamine and tyrosine hydroxylase immunoreactivities in the brain of two amphibians, the anuran *Rana ridibunda* and Urodele *Pleurodeles waltlii*. *J Comp Neurol* 303: 457-477
- Gozes I, Avidor R, Biegon A, Baldino H Jr (1989) Lactation elevates vasoactive intestinal peptide messenger ribonucleic acid in rat suprachiasmatic nucleus. *Endocrinology* 124: 181-186
- Green CB, Besharse JC (1994) Tryptophan hydroxylase expression is regulated by a circadian clock in *Xenopus laevis* retina. *J Neurochem* 62: 2420-2428
- Green CB, Cahill GM, Besharse JC (1995) Regulation of tryptophan hydroxylase expression by a retina circadian oscillator in vitro. *Brain Res* 677: 283-290
- Griffith R A (1985) Diel profile of behavior in the smooth newt, *Trisurus vulgaris* (L.): analysis of environmental cues and endogenous timing. *Animal behav* 33: 573-582
- Halliday T R and Sweatman HPA (1976) To breathe or not to breaths; The newt's problem. *Anim Behav* 24: 551-561
- Halliday T R and Worsnop A (1977) Correlation between activity and breathing rate in the smooth newt, *Triturus vulgaris* (Amphibia, Urodela, Salamandridae). *J Herpetol* 11(2): 244-246
- Harada Y, Goto M, Ebihara S, Fujisawa H, Kegasawa K, Oishi T (1998) Circadian locomotor activity rhythms in the African clawed frog, *Xenopus laevis*: The Role of the eye and the hypothalamus. *Biol Rhythm Res* 29: 30-48
- Hasegawa M and Cahill GM (1998) Cyclic AMP resets the circadian clock in cultured *Xenopus* retinal photoreceptor layers. *J Neurochem* 70: 1523-1531
- Hasegawa M and Cahill GM (1999) A role for cyclic AMP in entrainment of the circadian oscillator in *Xenopus* retinal photoreceptors by dopamine but not by light. *J Neurochem* 72: 1812-1820
- Hayashi T (1989) Diel activity of the Japanese newts, *Cynops pyrrhogaster*, in the field. *Japan J Herpetol.* 13: 47-48
- 本間さと (1999) 視交叉上核ニューロンにおけるサーカディアンリズムーリズム発現と時計遺伝子ー生体の科学 50(3): 169-174
- 本間研一、本間さと、寅重力 (1989) 生体リズムの研究 北海道図書刊行会

- Honma S, Ikeda M, Abe H, Tanahashi Y, Namihira M, Honma K, Nomura M (1998) Circadian oscillation of BMAL1, a partner of a mammalian clock gene Clock, in rat suprachiasmatic nucleus. *Biochem Biophys Res Commun* 250: 83-87
- Iigo M, Furukawa K, Hattori A, Hara M, Hara M, Ohtani-Kaneko R, Suzuki T, Tabata M, Aida K (1995) Effects of pinealectomy and constant light exposure on day-night changes of melatonin binding sites in the goldfish brain. *Neurosci Lett* 197: 61-64
- Iigo M, Hara M, Ohtani-Kaneko R, Hirata K, Tabata M, Aida K (1997) Photic and circadian regulations of melatonin rhythms in fishes. part 1: Pineal and Ocular photoreceptors. *Biological Signals* 6: 225-232
- Iigo M, Kezuka H, Aida K, Hanyu I (1991) Circadian rhythms of melatonin secretion from superfused goldfish (*Carassius auratus*) pineal glands in vitro. *Gen Comp Endocrinol* 83: 152-158
- Iigo M and Tabata M (1996) Circadian rhythms of locomotor activity in the goldfishes, *Carassius auratus*. *Physiol Behav* 60: 775-781
- 井上慎一 (1999) 日周期リズムと視交叉上核のバイオケミストリー 生体の科学 50(3): 193-199
- Inouye S-IT and Kawamura H (1982) Characteristics of a circadian pacemaker in the suprachiasmatic nucleus. *J Comp Physiol* 146: 153-160
- Irving Z, Theresa ML, Norman FR (1993) Circadian rhythms. 1 Temperature, seasonality and circadian rhythms. *Brain Research Review* 18:315-333
- Jaeger RG and Hailman JP (1973) Effects of intensity on the phototactic responses of adult anuran amphibians: A comparative survey. *Zeitschrift Tierpsychol* 33: 352-407
- Janik DS and Menaker M (1990) Circadian locomotor rhythms in the desert iguana. The role of the eyes and the pineal. *J Comp Physiol (A)* 166: 803-810
- Kavaliers M (1979) Seasonal change in the circadian period of the lake chub, *Couesius plumbens*. *Can J Zool* 56: 2591-2596
- Kavaliers M (1980) Pineal control of ultradian rhythms and short-term activity in a cyprinid fish, the lake chub, *Couesius plumbeus*. *Behave Neural Biol* 29: 224-235?*
- Kavalier M and Ross DM (1980) Twilight and day length affects the seasonality of entrainment and

- endogenous circadian rhythms in a fish, *Conesius plumbeus*. *Can J Zool* 59: 1326-1334
- Kawata A, Oishi T, Fukada Y, Shichida Y, Yoshikawa T (1992) Photoreceptor cell types in the retina of various vertebrate species: immunocytochemistry with antibodies against rhodopsin and iodopsin. *Photochemistry and Photobiology* 56: 1157-1166
- Kikuchi M and Aoki K (1982) The photoreceptor cell in the pineal organ of the Japanese common newt. *Experientia* 38: 1450-1451
- Kikuchi M and Aoki K (1984) The structure of photoreceptor cells in the pineal organ of the Japanese common newt, *Cynops pyrrhogaster pyrrhogaster*. *Zool Sci* 1: 701-709
- Kikuyama S, Toyoda F, Ohmiya Y, Matsuda K, Tanaka S, Hayashi H (1995) Sodefrin: A female-attraction peptide pheromone in newt cloacal glands. *Science* 267: 1643-1645
- King DP, Zhap Y, Sangoram AM, Wilsbacher LD, Tanaka M, Antoch MP, Steeves TD, Vitaterna MH, Kornhauser JM, Lowrey PL, Turek FW, Takahashi JS (1997) Positional cloning of the mouse circadian clock gene. *Cell* 89: 641-653
- Klein DC, Moore RY, Reppert SM (1991) *Suprachiasmatic Nucleus: The mind clock*. Oxford university press, Oxford
- Korenbrod JI and Fernald RD (1989) Circadian rhythm and light regulate opsin mRNA in rod photoreceptors. *Nature* 337: 454-457
- Le Fall F, Castel H, Louiset E, Vaudry H, Cazin L (1997) Multiple modulatory effects of the neuroactive steroid pregnenolone on GABAA receptor in frog pituitary melanotrophs. *J Physiol (Lond)* 504: 387-400
- Lehman MN (1987) Circadian rhythmicity restored by neural transplant. Immunocytochemical characterization of the graft and its interaction with the host brain. *J Neurosci* 7: 1626-1638
- Lihmann I, Netchitalo P, Feuilletoy M, Cantin M, Delarue C, Leboulenger F, De Lan A, Vaudry H (1988) Effect of atrial natriuretic factor on corticosteroid production by perfused frog interrenal slices. *Gen Comp Endocrinol* 71: 55-62
- Majewska MD and Schwartz RD (1987) Pregnenolone-sulfate; An endogenous antagonist of the γ -aminobutyric acid receptor complex in the brain? *Brain Res* 404: 355-360
- 松井正文 (1996) 両生類の進化 東京大学出版会
- Meier AH (1984) Temporal synergism of circadian neuroendocrine oscillations regulates seasonal conditions in the Gulf Killifish. *Transact Am Fish Soci* 113: 422-431
- Mensah-Nyagan AG, Feuilletoy M, Dupont E, Do-Rego JL, Leboulenger F, Pelletier G, Vaudry H

- (1994) Immunocytochemical localization and biological activity of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in the central nervous system of the frog. *J Neurosci* 14: 7306-7318
- Mensah-Nyagan AM, Feuilloley M, Do-Rego JL, Marcual A, Lange C, Tonon MC, Pelletier G, Vaudry H (1996) Localization of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase and characterization of testosterone in the brain of the male frog. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 1423-1428
- Mienville JM and Vicini S (1989) Pregnenolone sulfate antagonizes GABAA receptor-mediated currents via a reduction of channel opening frequency. *Brain Res* 489: 190-194
- Morita Y and Samejima M (1984) Control of diurnal and circadian locomotor rhythm by direct photosensory pineal organ. In: Aoki K, Ishii S, Morita H (eds) *Animal behavior, Neurophysiological and Ethological Approaches*. Japan Science Society Press, Tokyo, pp237-241
- 守屋孝洋、柴田重信 (1999) 概日リズムと細胞内信号系 生体の科学 50(3): 200-206
- Nagai K and Oishi T (1998) Behavioral rhythms of the Japanese newts, *Cynops pyrrhogaster*, under a semi-natural condition. *Int. J. Biometeorology* 41: 105-112
- Naruse M (1993) Plasticity of biological rhythms and its significance: analysis of the locomotor activity rhythm in the loach, *Misgurnus anguillicaudatus*. Ph. D. Dissertation, Nara Women's University, Nara. (in Japanese)
- Naruse M and Oishi T (1996) Annual and daily activity rhythms of loaches in an irrigation creek and ditches around paddy fields. *Environ Biol Fishes* 47: 93-99
- Obrietan K, Impey S, Storm DR (1998) Light and circadian rhythmicity regulate MAP kinase activation in the suprachiasmatic nuclei. *Nat Neurosci* 8: 693-700
- 岡村均、重吉康史 (1999) 生物時計の分子機構 細胞工学 18:698-707
- 大石正 (1991) 時間生物ハンドブック 2魚類。千葉喜彦、高橋清久 (編集) 朝倉書店 pp 69-77
- 大石正 (1999) 視物質および眼内の概日リズム。光シグナルトランダクション 14: 152-157
- Orchinik M, Murray TF, Moore FL (1994) Steroid modulation of GABAA receptors in an amphibian brain. *Brain Res* 646: 258-266
- Otani M (1995) Master's thesis, Nara Women's University, Nara.
- Paniagua R, Fraile B, Saez FJ (1990) Effects of photoperiod and temperature on testicular function

- in amphibians. *Histol Histopathol* 5: 365-378
- Pickard GE and Tang WX (1993) Individual pineal cells exhibit a circadian rhythm in melatonin secretion. *Brain Res* 627: 141-1462
- Provencio I, Jiang G, Grip WJD, Hayes WP, Rollag M (1998) Melanopsin: An opsin in melanophores, brain, and eye. *Neurobiology* 95: 340-345
- Rae MA, Glass JD, Colwell CS (1994) Serotonin modulates photic responses in the hamster suprachiasmatic nuclei. *J Neurosci* 14: 3635-3642
- Rowsemitt CN, Petterborg LJ, Claypool LE, Hoppensteadt FC, Negus NC, Berger PJ (1982) Photoperiodic induction of diurnal locomotor activity in *Microtus montanus*, the montane vole. *Can J Zool* 60: 2798-2803
- Rusak B and Zucker I (1979) Neural regulation of circadian rhythms. *Physiol Rev* 59: 449-526
- 佐藤真彦 (1996) 脳・神経と行動 1神経系の構造 pp1-24 岩波書店
- Sarthy PV and Lam DMK (1983) Retinal regeneration in the newt, *Notophthalmus viridescens*: Appearance of neurotransmitter synthesis and the electroretinogram. *Develop Brain Res* 6: 99-105
- Sawada S (1963) Studies on the local races of the Japanese newt, *C. pyrrhogaster* BOIE. 2 Sexual isolation mechanisms. *J Sci Hiroshima* 21: 168-180
- 佐原雄二 (1989) 魚類における周期活動の生態学1-捕食と被食の視点空-生物科学 第4巻 12: 57-67
- Schurov IL, McNulty S, Best JD, Sloper PJ, Hastings MH (1999) Glutamatergic induction of CREB phosphorylation and Fos expression in primary cultures of the suprachiasmatic hypothalamus in vitro is mediated by co-ordinate activity of NMDA and non-NMDA receptors. *J Neuroendocrinol* 1: 43-51
- Senchez-Vzquez FJ, Madrid JA, Zamora S, Iigo M, Tabata M (1996) Demand feeding and locomotor circadian rhythms in the goldfish, *Carassius auratus*: dual and independent phasing. *Physiol Behav* 60: 665-674
- Serino I, d'Istria M, Monteleone P (1993) A comparative study of melatonin production in the retina, pineal gland and harderian gland of *Bufo viridis* and *Rana esculenta*. *Comp Biochem Physiol C* 106: 189-193
- Shearman LP, Zylka MJ, Weaver DR, Kolakowski LF Jr, Reppert SM (1997) Two period homologs: circadian expression and photic regulation in the suprachiasmatic nuclei. *Neuron*

- Shibata S, Cassone VM, Moore RY (1989) Effects of melatonin on neuronal activity in the rat suprachiasmatic nucleus in vitro. *Neurosci Lett* 97: 1-2, 140-144
- Tabata M, Minh-Nyo M, Oguri M (1991) The role of the eyes and the pineal organ in the circadian rhythmicity in the cat fish *Silurus asotus*. *Nippon Smison Gahhoishi* 57: 607-612
- Takase M, Ukena K, Yamazaki T, Kominami S, Tsutsui K (1999) Pregnenolone, pregnenolone sulfate, and cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme in the amphibian brain and their seasonal change. *Endocrinology* 140: 1936-1944
- Takumi T, Taguchi K, Miyake S, Sakakida Y, Takashima N, Matsubara C, Maebayashi Y, Okumura K, Takekida S, Yamamoto S, Yagita K, Yan L, Young MW, Okamura H (1998) A light-independent oscillatory gene *mPer3* in mouse SCN and OVL. *EMBO J* 16: 4753-4759
- Tanaka S and Iwasawa H (1979) Annual change in testicular structure and sexual character of the Japanese newts, *Cynops pyrrhogaster pyrrhogaster*. *Zool Sci* 88: 295-305
- Tavolaro R, Canonaco M, Franzoni MF (1995) Comparison of melatonin-binding sites in the brain of two amphibians: an autoradiographic study. *Cell Tissue Res* 279: 613-617
- Tei H, Okamura H, Shigeyoshi Y, Fukuhara C, Oxawa R, Hirise M, Sasaki Y (1997) Circadian oscillation of a mammalian homologue of the *Drosophila* period gene (see comments). *Nature* 389: 512-6
- Tokura H and Aschoff J (1978) Circadian activity rhythms of the pig-tailed macaque, *Macaca nemestrina*, under constant illumination. *Pfugers Arch* 376: 241-243
- Tokura H and Aschoff J (1983) Effects of temperature on the circadian rhythm of pig-tailed macaques *Macaca nemestrina*. *Am. J. Physiol.* 245: 800-804
- Tosini G and Menaker M (1995) Circadian rhythm of body temperature in an ectotherm (Iguana Iguana). *J Biol Rhythms* 10: 248-255
- Tosini G and Menaker M (1998) Multioscillatory circadian organization in a vertebrate, iguana iguana. *J Neurosci* 18: 1105-1114
- 筒井和義 (1996) 新しい概念の脳内分子、ニューロステロイドーその発見と今後の研究展望ー 比較生理生化学 13: 3-13
- 筒井和義 (1999) 脳で新しく見出されたニューロステロイドの合成と作用〜生殖比較内分泌学の新展開〜 *Hormone frontier in gynecology* 6: 91-96
- Tsutsui K and Ukena K (1999) Neurosteroids in the cerebellar purkinje neuron and their actions (review). *Int J Mol Med* 4: 49-56

- Ueda M and Oishi T (1982) Circadian oriposition rhythm and locomotor activity in the medaka, *Oryzias latipes*. *J Interdiscipl Cycle Res* 13: 97-104
- Underwood H (1981) Circadian organization in the lizard *Sceloporus occidentalis*: The effects of pinealectomy, blinding, and melatonin. *J. Comp. Physiol. B* 141: 537-547
- Underwood H (1983) Circadian organization in the lizard *Anolis carolinensis*: a multioscillator system. *J. Comp. Physiol. A* 152: 265-274
- Underwood H (1983) Circadian pacemakers in lizards: phase-response curves and effects of pinealectomy. *American Physiological Society* 857-864
- Underwood H (1985) Pineal melatonin rhythms in the Lizard *Anolis carolinensis*: effects of light and temperature cycles. *J Comp physiol A* 157: 57-65
- Underwood H (1986) Light at night cannot suppress pineal melatonin levels in the lizard *Anolis carolinensis*. *Comp Biochem Physiol A* 84: 661-663
- Underwood H (1990) The pineal and melatonin: Regulators of circadian fncytion in lower vertebrates. *Experientia* 46: 121-128
- Underwood H (1991) 時間生物ハンドブック 第二版 両生類および爬虫類 (海老原史樹文訳) 2: 69-77 千葉喜彦、高橋清久編集 朝倉書店
- Underwood H and Calaban M (1987) Pineal melatonin rhythms in the lizard, *Anolis carolinensis*. Response to light and temperature cycles. *J. Biol. Rhythms* vol.2, No.3: 179-193
- Underwood H and Menaker M (1976)? Extraretinal photoreception in lizards. *Photophysiology* 23: 227-243 other1970*
- Veen VTH, Hartwig HG, Muller K (1976) Light-dependent motor activity and photonegative behavior in the eel (*Anguilla anguilla* L.). Evidenca for extraretinal and extrapineal photoreception. *J. Comp. Physiol.* 111:209-219
- Veen TV, Osteolom T, Gierschik P, Spiegel A, Somers R, Korf HW, Klein DC (1986) α -Transducin immunoreactivity in retinae and sensory pineal organs of adult vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 912-916
- Vigh-Teichmann I, Rohlich P, Vigh B, Aros B (1980) Comparison of the pineal complex, retina and cerebrospinal fluid contacting neurons by immunocytochemical antirhodopsin rezction. *Z mikrosk-anat Forsch, Leipzig* 94: 623-640
- Wiechmann AF (1986) Melatonin: parallels in pineal gland and retina. *Exp Eye Res* 42: 507-527

- Yokota T and Oishi T (1992) Seasonal change in the locomotor activity rhythm of the medaka, *Oryzias latipes*. *Int J Biometeorol* 36: 39-44
- Yoshikawa T and Oishi T (1998) Extraretinal photoreception and circadian systems in nonmammalian vertebrates. *Comp Biochem Physiol* 119: 65-72
- Yoshikawa T, Yashiro Y, Oishi T, Kokame K, Fukada Y (1994) Immunoreactivities to rhodopsin and Rod/Cone transducin antisera in the retina, pineal complex and deep brain of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Zool Sci* 11: 675-680
- Yoshikawa T, Okano T, Oishi T, Fukada Y (1998) A deep brain photoreceptive molecule in the toad hypothalamus. *FEBS Lett* 424: 69-72
- Zerani M, Vellano C, Amabili F, Carnevali O, Andoreoletti GE, Polzonetti-Magni A (1991) Sex steroid profile and plasma vitellogenin during the annual reproductive cycle of the crested newt (*Triturus cristatus* Laur.). *Gen Comp Endocrinol* 82: 337-344
- Zylka MJ, Shearman LP, Levine JD, Jin X, Weaver DR, Reppert SM (1998) Molecular analysis of mammalian timeless. *Neuron* 5: 1115-1122

8. 要旨

脊椎動物の系統進化において、水中生活から陸上生活に移行する重要な位置を占める両生類のアカハライモリを用いて、(1) 準自然条件下における概日行動リズムの季節変化、(2) 概日行動リズムに関与する環境要因の解析、(3) 生殖腺および脳内ニューロステロイドの季節変化と光周期の影響、(4) 光受容部の同定とそこからの神経投射について、研究を行った。

準自然条件下で、アカハライモリ *Cynops pyrrhogaster* の日周期リズムを記録したところ、季節変化が観察された。水中での活動は、年間を通じて約6回の昼夜逆転の日周期活動の位相の変動が見られた。

上陸、生殖など各行動について、日周期的リズムの観察を行ったところ、各々異なる日周期リズムと季節変化が見られた。上陸活動は、夜行性を示し、初夏に頻繁に見られ、冬には見られなかった。生殖活動は、春、秋、冬に薄明薄暮にピークの見られる日周期を示し、夏には観察されなかった。

早朝に頻繁に活動する性行動の観られる時期には、水中の這行リズムは昼行性を示した。夜間に観られる上陸活動の増加した時期には、夜行性を示した。季節的に行動内容が変化することが、水中での歩行活動リズムの季節変化の原因と考えられた。

実験条件下で行動ごとにリズムを記録したところ、照度を交互に変えたサイクルへの同調個体数は、温度によって変化した。また、温度サイクルに対する活動位相が照度によって異なることが観察されたことから、照度と温度の相互関係により、活動の位相が決定されていると考えられる。さらに行動内容によって選択する環境が異なることが観察された。

温度サイクルとLDサイクルを同時に与えると、這行は光に強く影響されたが、呼吸は温度に影響されやすかった。行動内容によって、影響しやすい環境因子が異なることがわかった。

フリーランニングリズムを検討したところ、有意な周期を示す個体が20°CDDで約50%であった。また、環境や行動内容によって異なる周期を示す場合があった。

以上より、イモリは複数の振動体を持つことが示唆された。行動ごとに異なる振動体とカップリングしている可能性が高いと考えられる。

生殖行動を誘導するシステムを調べるため、ニューロステロイドに着目し調べたところ、イモリの脳でもニューロステロイドが合成されていることが明かとなった。

準自然条件下で飼育したイモリで、脳内ニューロステロイド濃度の季節変化および生殖腺サイクルとの関連を調べた。プロゲステロンとプレグネノロン硫酸エステルは、生殖腺と同様に10月に高くなる季節変化が観察され、繁殖に関与していると可能性が示された。

恒温室で長日、短日処理したところ、生殖腺は各季節とも光周期に対する反応は顕著ではなかった。プロゲステロンとプレグネノロンは、秋に長日で高くなる傾向が観られ、時期特異的に、光周期との関連が見られた。生殖腺とは異なる調節システムによっていると考えられる。

眼球と松果体を破壊した個体で、光周期の影響を調べた。プレグネノロンと生殖腺は、両方破壊しても光周期反応が見られ、脳深部光受容体が機能していることが示唆された。生殖腺は、松果体を破壊したときのみ反応が見られるので、松果体が光周性に対し抑制的に機能していると考えられた。光周期情報は、複数の器官で受けとられ、促進的と抑制的な信号があり、各々異なる信号を送っていると考えられる。プロゲステロンは、眼球のみ破壊すると光周期の影響が見られることから、松果体が促進的、眼球が抑制的に機能していると考えられることができる。プレグネノロン硫酸エステルは、光周期に影響を受けなかった。異なる環境要因の調節を受けていることから、異なる役割を請け負っていると予想される。

イモリの脳深部光受容体は、季節変化や光周性など年周期システムとして機能している可能性が示唆された。

さらに詳細に検討するため、組織化学的に解析したところ、新たに眼球、松果体以外に、脳深部SCNでの視物質ロドプシン抗体による免疫反応が観られ、SCNでの光受容の可能性が示唆された。

各光受容器官の役割を調べるため、神経連絡の観察を行ったところ、眼球、松果体からは、視葉に投射しており、視葉で情報が統合されている可能性が示唆された。脳深部SCNからは、その周辺部への投射が観察された。視床への投射は繁殖行動や内分泌系へ関与していることを示唆しており、ここへは視葉からの投射も観察されている。SCNでのニューロステロイド合成は脳深部光受容体の直接の制御を受けており、他の光受容器官からの情報は視床を介して、影響していることが示唆された。

イモリの行動リズムは、上陸活動や呼吸活動のような環境の変化により活動量に変化するものと、生殖行動のような外的因子の影響を受けながら半独立に変化する内因性因子により発現、消失するものがある。

年周期システムと日周期システムは関連しており、年周期的変化が日周期リズムに変化をもたらすことが、明かとなった。さらに、脳深部光受容-振動体システムが関与していることが示唆された。

9. 概要

Following studies were performed using the Japanese newt, *Cynops pyrrhogaster*.

(1) Seasonal changes of circadian behavioral rhythms under a semi-natural condition, (2) Analysis of circadian behavioral rhythms, (3) Seasonal changes in the gonadal activity and brain neurosteroids and the effects of photoperiods, (4) Photoreceptors and the neural projection.

Under a semi-natural condition, circadian locomotor activity rhythms of Japanese newts showed seasonal changes. Circadian locomotor activity rhythms showed diurnal pattern during breeding season when mating behavior was active in the early morning, and nocturnal pattern during early summer when landing activity at night increased. Therefore, seasonal changes in behavioral activity seems to induce seasonal changes in circadian locomotor activity rhythms.

Under experimental conditions, locomotor activity rhythm was affected more by LD cycle and respiratory activity was affected more by temperature cycle. And each behaviors had different free-running periods. The phase of each behavioral rhythm seems to be determined by different environmental factors. The results indicate multi-oscillator system is involved.

It became clear that newts synthesize neurosteroids in the brain, such as progesterone and pregnenolone sulfate. The neurosteroids increased at breeding seasons, indicating close relationship with breeding. In lesion experiments, the deep brain photoreceptor is involved in photoperiodic regulation of the testis and brain pregnenolone.

Immunohistochemistry using antiserum against rhodopsin revealed immunopositive cells in the pineal and deep brain (SCN). Neural projections from the pineal, eye and SCN to the thalamus were observed by tracer experiments.

Multi-photoreceptor and multi-oscillator system in newts was discussed in relation to circadian rhythms and seasonal changes.

10. 謝辞

指導教官である大石 正教授、副指導教官である荒木 正介教授、登倉 尋實教授（奈良女子大学）のご指導ご鞭撻に厚くお礼申し上げます。

有尾両生類についての情報を提供して下さり、ニューロステロイド濃度を測定してくださいました筒井 和義教授、浮穴 和義助手、稲井 雄人様（広島大学）、抗体を作成し、提供して下さいました深田 吉孝教授、岡野 恵子様（東京大学）、行動リズムの記録や解析についてご助言いただいた千葉 篤彦助教授（上智大学）、野外での生態調査の情報を提供して下さいました林 光武様（栃木国立博物館）、丸野内 淳介様（広島大学）、予備実験のための設備にご協力いただいた益田 敦子非常勤講師（奈良女子大学）に感謝します。