博士（理　学）　小　沼　　健

学 位 論 文 題 名

Molecular endocrine bases of spawning migration in salmonids

（サケ科魚類の産卵回遊の分子内分泌学的基盤）

学位論文内容の要旨

シロザケは外洋で成長した後，母川に回帰し，産卵して一生を終える．この産卵回遊は，生殖のための本能行動であり，「遺伝子にプログラム」されていると言われる．このサケの産卵回遊は，回遊にともなう生理現象が母川回帰の時間軸にそって正しく発現することによって可能となる．一般的に，本能行動およびそれにともなう多くの生理現象は脳・視床下部と下垂体を中心とする神経内分泌系が産生するホルモンにより制御されている．海水中で生きて行くためには成長ホルモン(GH)が，索餌し成長したのち性的に成熟するためには生殖腺刺激ホルモン(GTH)が重要である．母川を遡上するときにはプロラクチン(PRL)が淡水適応ホルモンとして働く．また，最終性成熟のときには GTH とソマトラクチン(SL)の合成・分泌が高まる．産卵回遊の成功には，これらのホルモンの遺伝子発現が，母川回帰の時間軸にそって正しく調節されることが必須である．

産卵回遊は生殖のための本能行動であることから，その制御には生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) を情報因子とする視床下部-下垂体-生殖腺系 (HPG 系) が中心的な役割を担っていると考えられる．GnRH ニューロンは多数の脳領域および下垂体に投射しており，中枢神経系と末梢神経系の電気活動および下垂体ホルモンの分泌活動を高めることを介して回帰行動を促進している．これまでに，池産のサクラマスでは，「生殖腺が発達し始める時期」と「最終性成熟の時期」の二度にわたりサケ GnRH (sGnRH) 遺伝子および上記の下垂体ホルモン遺伝子の発現量が高まることが明らかになっている．同様の時間軸に沿った変動はシロザケにも存在すると考えられるため，スケールの大きな産卵回遊の「遺伝子プログラム」の実体も，sGnRH および HPG 系を中心に解析することで手がかりが得られると考えられる．

本研究では，sGnRH および下垂体ホルモンをコードする遺伝子の発現量が，シロザケの産卵回遊の「最終性成熟の時期」にどのように発現変動するか調べた．はじめに，シロザケの遡上にともなう HPG 系の動態を，6 年間にわたる血中のステロイドホルモン量を指標に解析した（第 1 章）．続いて，2 つの河川系郡で，淡水移行と最終性成熟にともなう下垂体ホルモン遺伝子の発現変動を解析した（第 2 章）．さらに，脳内各部域における sGnRH 遺伝子の発現動態を調べた（第 3 章）．また，HPG 系における下垂体の制御機構について知見を得るため，サクラマスの下垂体細胞を用いて，sGnRH と性ステロイドホルモンが下垂体ホルモンおよびその転写調節因子の遺伝子発現に与える作用を解析した（第 4-5 章）．

はじめに，石狩-千歳川水系に遡上するシロザケから 1995-2000 年にわたり採取した血液について，血中ステロイドホルモン濃度の変動を指標に HPG 系の動態を調べた．その結果，テストステロン(T) と 11-ケトテストステロン(11KT)の濃度および生殖腺の成熟度が年により異なっていた．一方，沿岸の海水温も年により異なっていた．母川回帰時の遊泳行動は海水温により左右さ

れるため，海洋環境のHPG系の活動への影響を検証する目的で，北海道沿岸の表面海水温(SST)との関係を調べたところ，SSTが高い年は血中のTおよび11KT濃度が他の年に比べ高く，遡上時にはより性成熟が進行していることが分かった．冷水魚であるシロザケは，水温が高い年は母川に入る時期が遅れ，その間に性成熟の時系列変化が進行し，血中のTおよび11KT濃度が高まると考えられる．一方，全ての年でエストラジオール17β (E2)濃度は減少し，卵成熟誘起ホルモン17α-20β-dihydroxy-4-pregnen-3-onおよびコルチゾル濃度は上昇していた．(第1章)．

次に，長さの異なる二つの河川，北海道の石狩川と三陸の大槌川に回帰するシロザケをもちいて，最終性成熟と淡水移行にともなう下垂体ホルモン遺伝子の発現動態を調べた．その結果，GTH IIβおよびSLのmRNA量は，海水・淡水に関係なく産卵場までの長さに依存して起こることが示唆された．さらに，海水から淡水への移行実験を行った結果，GTH IIβおよびSLのmRNA量は，海水・淡水中いずれでも最終性成熟の進行とともに上昇した．一方，淡水適応ホルモンのPRLのmRNA量は，淡水移行では変化せず，最終性成熟が進行した個体では海水中でも高まった．淡水中で産卵するサケ科魚類では，PRL遺伝子の発現も最終性成熟の進行とともに上昇する可能性がある（第2章)．

さらに，第1章で解析した石狩川に回帰するシロザケの試料をもちいて，脳内における二種類のsGnRH遺伝子 (sGnRH-I, -II) の発現変動を調べた．sGnRHニューロンは嗅球から視床下部にかけて脳の腹側に散在している．そこで，脳を凍結切片法で部域毎に分け，sGnRH -I, -IIのmRNA量をリアルタイムPCR法で測定した．1997-1999年にわたり採取された試料を解析した結果，ほぼ全ての脳部域で，遡上にともないsGnRH mRNA量が上昇することが分かった．このsGnRHの遺伝子発現と対応して，下垂体中のGTH IIβおよびSLのmRNA量も上昇することが確かめられた．以上の結果は，母川の遡上時に脳内のsGnRHニューロンが活性化し，下垂体と脳両方に働いて，最終性成熟と遡上行動を協調的に促進していることを支持するものである（第3章)．

第1-3章で明らかになった，下垂体ホルモン遺伝子の発現変動の制御機構について知見を得るため，性成熟開始期，性成熟前期，性成熟後期および産卵期のサクラマスから下垂体細胞を採取し，sGnRH，T，11KTおよびE2存在下で培養したのち，GH/PRL/SLファミリーおよびその転写調節因子Pit-1のmRNA量を測定した．その結果，性成熟後期と産卵期にのみ，性ステロイドホルモンがPRL, SLおよびPit-1のmRNA量を変化させることが分かった．性成熟が進行したサケでは，性ステロイドホルモンが転写調節因子Pit-1を介してPRLおよびSL遺伝子の発現を制御していると考えられる（第4章)．

サケ科魚類では，sGnRHと性ステロイドホルモンがGTH遺伝子の発現を成熟時期特異的に制御する．この制御には，サケGTHプロモーターの調節に必須な転写調節因子である*Fushi tarazu* factor 1 (sFF-1) およびエストロゲン受容体α (ERα)が関わっていると考えられる．そこで，第4章で用いた下垂体細胞についてsFF-1およびERαのmRNA量を測定した．性成熟開始期，前期にはsGnRHおよび性ステロイドホルモンがこれらの転写調節因子のmRNA量を増加させた．一方，性成熟後期には，性ステロイドホルモンによりmRNA量が減少した．以上の結果から，sGnRHおよび性ステロイドホルモンがsFF-1とERαを介してGTH遺伝子の発現を制御していること，またその作用は性成熟の時期によって異なることが示された（第5章)．

以上に述べた一連の研究により，性成熟の時間軸により規定される「ホルモン遺伝子の発現プログラム」が，「最終性成熟の時期」，すなわち母川の遡上時期に存在することが示された．これらの結果は，池産のサクラマスで得られた時系列変化ともよく符合しており，母川回帰の時間軸により規定される「ホルモン遺伝子の発現プログラム」が，サケの産卵回遊を成功に導くものと考えられる．さらに，本研究の結果は，産卵回遊の遺伝子プログラムの実体が，HPG系で見られる遺伝子レベルの変化を時間的な基軸にすることで理解できることを示している．上述した池産

のサクラマスでは，「生殖腺が発達し始める時期」に sGnRH 遺伝子の発現が上昇するが，同様の時系列変化は野生のシロザケでも見られることが期待される．この時期は，シロザケがベーリング海から日本に向かい回帰を始める時期に対応するので，「母川回帰を開始する時期」にも HPG 系の活性化が起こっていると予想される．すでにベーリング海のシロザケからも試料を入手しているので，今後はこの点を明らかにしていきたい．

学位論文審査の要旨

主　査　　教　授　　浦　野　明　央

副　査　　教　授　　小　池　達　郎

副　査　　教　授　　高　畑　雅　一

副　査　　助教授　　伊　藤　悦　朗

学位論文題名

Molecular endocrine bases of spawning migration in salmonids

(サケ科魚類の産卵回遊の分子内分泌学的基盤)

申請者による学位論文は，シロザケの産卵回遊の制御機構を解明することを目指して行った研究の成果をまとめたものであるが，とくにsGnRHおよび下垂体ホルモンをコードする遺伝子の発現量が，シロザケの産卵回遊の最終性成熟の時期にどのように変動するかを定量的に明らかにしている。

はじめに，石狩-千歳川水系に遡上するシロザケから1995-2000年にわたり採取した血液について，血中ステロイドホルモン濃度の変動を指標にHPG系の動態を調べた．その結果，テストステロン(T)と11-ケトテストステロン(11KT)の濃度および生殖腺の成熟度が年により異なっていた．母川回帰時の遊泳行動は海水温により左右されるため，北海道沿岸の表面海水温(SST)との関係を調べたところ，SSTが高い年は血中のTおよび11KT濃度が他の年に比べ高く，遡上時にはより性成熟が進行していい．これらの結果は，水温が高い年にはサケが母川に入る時期が遅れ，その間に性成熟の時系列変化が進行してしまうことを示している．

次に，長さの異なる北海道の石狩川と三陸の大槌川に回帰するシロザケを用いて，最終性成熟と淡水移行にともなう下垂体ホルモン遺伝子の発現動態を調べた．その結果，GTH IIβおよびSLのmRNA量は，海水・淡水に関係なく産卵場までの長さに依存して起こることが示唆された．さらに，海水から淡水への移行実験では，GTH IIβおよびSLのmRNA量が，海水・淡水中いずれでも最終性成熟の進行とともに上昇した．一方，淡水適応ホルモンのPRLのmRNA量は，淡水移行では変化せず，最終性成熟が進行した個体では海水中でも高まった．淡水中で産卵するサケ科魚類では，PRL遺伝子の発現も最終性成熟の進行とともに上昇すると考えられる．

下垂体遺伝子の発現調節に関わる脳内神経ホルモン遺伝子の発現は，石狩川に回帰するシロザケの試料を用い，脳内における二種類のsGnRH (sGnRH-I, II) mRNA量の変動を指標に調べた．脳は凍結切片法で部域毎に分け，sGnRH -I, -IIのmRNA量をリアルタイムPCR法で測定した．1997-1999年にわたり採取された試料を解析した結果，ほぼ全ての脳部域で，遡上にともないsGnRH mRNA量が上昇していた．このsGnRH遺伝子の発現と対応して，下垂体中のGTH IIβおよびSLのmRNA量も上昇することが確かめられた．以上の結果は，母川の遡上時に脳内のsGnRHニューロンが活性化し，下垂体と脳両方に働いて，最終性成熟と遡上行動を協調的に促進していることを支持するものである．

以上で明らかになった下垂体ホルモン遺伝子の発現変動について，その制御機構についての知見を得るため，成熟過程を追ってサクラマスから下垂体細胞を採取し，sGnRH，T，11KT および E2 存在下で培養したのち，GH/PRL/SL ファミリーおよびその転写調節因子 Pit-1 の mRNA 量を測定した．その結果，性成熟後期と産卵期にのみ，性ステロイドホルモンが PRL, SL および Pit-1 の mRNA 量を変化させることが分かった．性成熟が進行したサケでは，性ステロイドホルモンが転写調節因子 Pit-1 を介して PRL および SL 遺伝子の発現を制御していると考えられる．

申請者はこれら一連の研究により，性成熟の時間軸により規定される「ホルモン遺伝子の発現プログラム」が，「最終性成熟の時期」，すなわち母川の遡上時期に存在すること，母川回帰の時間軸により規定される「ホルモン遺伝子の発現プログラム」がサケの産卵回遊を成功に導いていること，さらに，産卵回遊の遺伝子プログラムの実体が，HPG 系で見られる遺伝子レベルの変化を時間的な基軸にすることで理解できることを示した。これらの成果はすでに 4 編の原著論文として専門の国際誌に受理・公表されているばかりでなく，国際比較内分泌学会（ボストン，2005 年 5 月）における発表では栄誉ある Jimmie Dodd 賞を授与されている。

したがって，申請者は優れた研究業績を上げた若手研究者として国際的にも評価されており，北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格を十分に有するものと認める．