

学位論文題名

Expression of Neurohypophysial Hormone

Genes in Pre-Spawning Chum Salmon

(母川回帰時のシロザケにおける下垂体神経葉ホルモン遺伝子の発現)

学位論文内容の要旨

河川で孵化したサケの稚魚は川を下り、海洋で成長した後、産卵のため生まれた川に回帰する。このようなサケの回遊行動は、回遊にともなう生理現象が遺伝子プログラムに従い時間軸にそって順序正しく発現することによって可能となる。一方、その生理現象は神経系および内分泌系の調節を受けている。視床下部神経内分泌系は神経系と内分泌系の機能を統合する中枢であり、神経葉ホルモンをはじめとする多くの生理活性物質を産生している。神経葉ホルモンは、多くの動物の浸透圧調節に関わるペプチドであり、生殖活動にも重要であることが示されている。硬骨魚類の神経葉ホルモンであるバソトシン(VT)およびイソトシン(IT)も同様の働きを持つ。サケ科魚類では VT が淡水適応に関わることが示唆されており、母川回帰におけるその役割に興味を持たれる。したがって、母川回帰時の神経葉ホルモン遺伝子の発現を解析することにより、ホルモンの生理的役割のみならず回遊の遺伝子プログラムに関する手がかりが得られる可能性がある。

これらのことから、本研究では母川回帰時の神経葉ホルモン遺伝子の発現を解析した。解析に先立ち、魚種によるホルモン遺伝子の塩基配列の相違度を知るために、サケ属魚類であるヒメマスの IT-I 前駆体 cDNA の塩基配列を解析した。次いで母川回帰時における脳内の蛋白質合成活動の指標となるものとして、リボソーム蛋白 S2 に着目し、その cDNA の塩基配列を解析した。これらの知見を得た上で、母川回帰時のシロザケ脳内の VT および IT 遺伝子の発現の変動を解析した。最後に、浸透圧刺激が母川回帰時のシロザケの VT および IT 遺伝子の発現に及ぼす影響を解析した。

第1章：ヒメマスの IT-I 前駆体 cDNA の配列解析

ホルモン遺伝子の発現の解析は、ホルモンの生理作用を明らかにする上で非常に有用である。しかし魚類では、同じホルモンをコードする遺伝子の塩基配列が種によって大きく異なる可能性があるため、それぞれの種で塩基配列を明らかにする必要がある。さらに、多くの魚類では、進化の過程で染色体の重複が起きているため、発現の解析には注意が必要である。そこでまず、ヒメマスの IT-I 前駆体 cDNA の塩基配列を解析し、これまでに明らかとなっている配列と比較した。さらにサケ属におけるゲノム中の神経葉ホルモン遺伝子の存在について解析した。

その結果、神経葉ホルモン遺伝子は、サケ属魚類の間で非常に相同性が高く、異なる魚種から得られた cDNA でも特異的なプローブとして使用できることが示された。また、調べたすべてのサケ属魚類のゲノム中には、VT-I, VT-II, IT-I および IT-II の 4 種類の神経葉ホルモン遺

伝子が存在していることが明らかとなった。

第2章：ヒメマスのリボソーム蛋白 S2 をコードする cDNA の塩基配列の解析

母川回帰時のサケでは内分泌系が大きく変化しているため、神経分泌細胞の蛋白合成活動が変化している可能性がある。そこで、細胞の蛋白合成活動の指標となるものとしてリボソーム蛋白 S2 に着目し、cDNA の塩基配列を決定した。その結果、ヒメマスの S2 cDNA は 933 塩基であり、294 アミノ酸残基の蛋白をコードしていることが示された。

第3章：母川回帰にともなうシロザケの神経葉ホルモン遺伝子の発現の変動

母川回帰時に石狩川の河口に近い定置網および上流の千歳で捕獲したシロザケを用いて、神経葉ホルモン mRNA の量をノーザンブロットにより解析した。定量的な解析を行うため、mRNA と相同な配列を持つ 1 本鎖 DNA を調製し、これを標準物質として用いる系を開発した。調製した 1 本鎖 DNA を用いた検量線は、センス RNA を用いたものと一致した。従って、この 1 本鎖 DNA は、RNA の定量の標準物質として使用可能であることが確かめられた。

1993 年および 1994 年の 2 年間にわたり解析した結果、IT mRNA 量の変動は、雌雄ともに海と川の間で有為な差はみられなかった。一方 VT mRNA 量の変動は雌雄で大きく異なっており、雄では有為な差が無かったのに対して、雌では有意に約 40% 減少していた。このことから、母川回帰時の神経葉ホルモン遺伝子の発現の調節は雌雄で異なることが示唆された。また、この時の S2 蛋白の遺伝子発現に雌雄差は無く、川のサケでは発現量がやや減少するが、有意差は無いことが示された。したがって、最終成熟段階の雌では VT 遺伝子の発現を積極的に抑制する機構が働いていることが示唆された。

第4章：母川回帰時のシロザケの神経葉ホルモン遺伝子発現に対する浸透圧刺激の影響

母川回帰時の岩手県三陸沖のサケを、外洋、湾口、湾内および川で捕獲し、神経葉ホルモン遺伝子の発現を調べたところ、北海道のシロザケと同様の雌雄差がみられ、VT-I mRNA が湾内で捕獲した雌で有意に減少していることが明らかとなった。さらに、湾口で捕獲したシロザケを淡水および海水中で飼育し、神経葉ホルモン mRNA 量の変動を解析した。その結果、淡水群では、雌雄ともに 1 日目で mRNA 量が減少し、2 日目以降はほぼ一定であった。一方、海水群の雄では飼育日数にともなって mRNA 量が増加していたのに対し、雌では減少していることが明らかとなった。以上の結果は、最終成熟段階で神経葉ホルモン遺伝子が、雌雄で異なる発現調節を受けていることを示すものである。特に雌における mRNA 量の減少は、自然状態および実験群の両者で観察されたことから、回遊行動の最終段階で VT 遺伝子の発現をおさえるという遺伝子プログラムが働いている可能性が示唆された。

以上に述べた一連の研究により、母川回帰時のシロザケでは、神経葉ホルモン遺伝子の発現が雌雄で異なる調節を受けていることが明らかとなった。この結果は系統の異なる二群間において自然状態で観察され、さらに実験群においても再現されたことから、回遊行動の遺伝子プログラムによって普遍的に引き起こされる現象であることが示唆された。また、VT および IT 遺伝子の上流領域には、いくつかのステロイド応答配列が見いだされていることから、この遺伝子プログラムに対してステロイドホルモンが関わっている可能性がある。以上のことから、母川回帰時の神経葉ホルモン遺伝子の発現調節は、遺伝的にプログラムされており、その調節にステロイドホルモンが関与する可能性が示唆された。さらにその遺伝子プログラムは、雌雄で異なることが示された。また、回遊行動の最終段階で VT 遺伝子発現に著しい雌雄差が見られることから、この時期のシロザケでは VT は浸透圧調節というよりむしろ性行動に関与している可能性が示された。

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 教 授 米 田 好 文
副 査 教 授 高 橋 孝 行

学 位 論 文 題 名

Expression of Neurohypophysial Hormone

Genes in Pre-Spawning Chum Salmon

(母川回帰時のシロザケにおける下垂体神経葉ホルモン遺伝子の発現)

河川で孵化したサケの稚魚は川を下り、海洋で成長した後、産卵のため生まれた川に回帰する。このようなサケの回遊行動は、回遊にともなう生理現象が遺伝子プログラムに従い時間軸にそって順序正しく発現することによって可能となる。一方、神経葉ホルモンは浸透圧調節および生殖に関わるホルモンで、魚類の神経葉ホルモンであるバソトシン(VT)およびイソトシン(IT)も同様の働きを持つ。したがって、母川回帰時の神経葉ホルモン遺伝子の発現を解析することにより、ホルモンの生理的役割のみならず回遊の遺伝子プログラムに関する手がかりが得られる可能性がある。これらのことから本論文の著者は母川回帰時の神経葉ホルモン遺伝子の発現を解析し、以下のことを明らかにした。

1) 母川回帰時に石狩湾および千歳川で捕獲したシロザケを用いて、神経葉ホルモン mRNA の量をノーザンブロットにより定量的に解析した。1993 年および 1994 年の 2 年間にわたり解析した結果、IT mRNA 量の変動は、雌雄ともに海と川の間で有為な差はみられなかった。一方 VT mRNA 量の変動は雌雄で大きく異なっており、雄では有為な差が無かったのに対して、雌では有意に約 40%減少していた。このことから、母川回帰時の神経葉ホルモン遺伝子の発現の調節は雌雄で異なることが示唆された。また、この時の S2 蛋白の遺伝子発現に雌雄差は無く、川のサケでは発現量がやや減少するが、有意差は無いことが示された。したがって、最終成熟段階の雌では VT 遺伝子の発現を積極的に抑制する機構が働いていることが示唆された。

2) 母川回帰時の岩手県三陸沖のサケを、外洋、湾口、湾内および川で捕獲し、神経葉ホルモン遺伝子の発現を調べたところ、北海道のシロザケと同様の雌雄差がみられた。さらに、湾口で捕獲したシロザケを淡水および海水中で飼育し、神経葉ホルモン mRNA 量の変動を解析したところ、雌雄で異なる変動パターンを示した。これらの結果は、最終成熟段階で神経葉ホルモン遺伝子が、雌雄で異なる発現調節を受けていることを示すものである。特に雌における mRNA 量の減少は、自然状態および実験群の両方で観察されたことから、回遊行動の最終段階で VT 遺伝子の発現をおさえるという遺伝子プログラムが働いている可能性が考えられる。

著者は、以上に述べたように、母川回帰時のシロザケでは、神経葉ホルモン遺伝子の発現が雌雄で

異なる調節を受けていることを明らかにし、回遊の遺伝子プログラムに雌雄差があることを初めて示した。しかも、それが系統の異なる二群間において自然状態で観察され、さらに実験群においても再現されたことから、回遊行動の遺伝子プログラムによって普遍的に引き起こされる現象であることを示唆している。これらの先端的な成果は、サケの母川回帰だけでなく、本能行動を分子レベルで理解するために大きく貢献するものである。

よって、著者は、北海道大学博士（理学）の学位を授与される資格を有するものと認める。