

学 位 論 文 題 名

ヒラメの変態に関する発生学的・内分泌学的研究

学位論文内容の要旨

ヒラメ養殖の発展や天然資源の増大を目的としたヒラメ稚魚の放流事業の拡大に伴い、全国各地で膨大な量のヒラメ種苗が生産されるようになってきている。しかしながら、種苗生産過程において、しばしば疾病などによる大量斃死や体色異常個体の出現が報告されており、安定的に良質な種苗をつくるうえでの問題点となっている。

ヒラメは初期発育過程において眼の移動、体形の扁平化、生活場所の移動などを特徴とする変態をする。変態期を境に罹病する疾病の種類が変わることや、変態期に与えた飼料やその時の飼育環境が体色異常個体の出現率に影響を与えることが知られており、良質の種苗を生産する技術をつくるうえで、ヒラメの変態現象を理解することは重要であると考えられる。

これまでの研究により、ヒラメの変態は脳下垂体－甲状腺系のホルモン情報に基づき誘導されることが明らか

にされている。本研究では、それを継承、発展させ、ヒラメの変態期に起こる組織・器官の発達とそれに及ぼす甲状腺ホルモンの役割、さらに甲状腺ホルモンの作用経路を解明することを試みた。

第1章では、変態期の体側筋の発達過程を組織学的、生化学的に検討し、さらに体側筋の発達における甲状腺ホルモンの役割を調べた。組織学的観察の結果、変態前の仔魚の筋線維は細く、その中に含まれる筋原線維の数も少なかったが、変態期間に筋組織は著しく発達し、筋原線維で充満した太い筋線維からなる成魚と同じ構造の筋組織になることが判明した。また筋原線維蛋白質について生化学的に調べた結果、変態期を境として、種々の筋原線維蛋白質の発現に消長があることが分かった。ミオシンでは、DTNB軽鎖(LC2)にアイソフォームの転換がみられ、変態前の仔魚は成魚にはないLC2*成分を有したが、変態最盛期に成体型アイソフォームのLC2が現れ、徐々にLC2*にとって替わった。トロポニンTでは、モノクローナル抗体に対する抗原性から5種類のアイソフォームが見出され、それらは変態前の仔魚に特異的もしくは多量に存在するもの、変態期以降出現するもの、定常的に存在するものに大別された。さらに、変態期の体側筋の発達に及ぼす甲状腺ホルモンの役割を検討した。変態前の仔魚への甲状腺ホルモンの投与によって体側筋の

組織構造の発達や筋原線維蛋白質の変遷は早期に誘導され、逆に抗甲状腺剤の投与によってこれら一連の変化は抑制された。これらの実験結果は、変態期に起こる体側筋の発達は甲状腺ホルモンによって制御されていることを意味する。また、変態終了後の稚魚に抗甲状腺剤を投与したが、筋原線維蛋白質の構成に変化はみられず、変態後の筋原線維蛋白質の合成とその発現の維持に甲状腺ホルモンは必要ないことが分かった。

高等脊椎動物における研究によると、甲状腺ホルモンは、標的細胞の核内に存在する甲状腺ホルモンリセプターを介して作用する。第2章では、変態期ヒラメで発現している甲状腺ホルモンリセプターを同定するために、変態期ヒラメ cDNAライブラリーからそれをコードする cDNA の単離を試みた。その結果、3種類の甲状腺ホルモンリセプター cDNA を単離し、それらの塩基配列を決定した。これまでに報告されている他の動物由来の甲状腺ホルモンリセプターとアミノ酸配列の比較をした結果、3種類のうち2種は α 型 (fTHR α A, α B と命名.), 残りの1種は β 型 (fTHR β 1) の甲状腺ホルモンリセプターと同定された。さらに PCR 法を用いて、ヒンジ領域が fTHR β 1 より 20 アミノ酸残基分長い以外は全く同じ塩基配列を持つと推定される β 型甲状腺ホルモンリセプター (fTHR β 2) も存在することを明らかにした。これら4種類の甲状腺ホルモ

ンリセプターをコードする遺伝子のゲノム中での存在様式を検討し、 $fTHR\alpha A$ と $fTHR\alpha B$ は別の遺伝子座でコードされていること、 $fTHR\beta 1$ と $fTHR\beta 2$ は1つの遺伝子座でコードされており、おそらくそれらはスプライシングのされ方の違いによって作られることを明らかにした。

第3章では、甲状腺ホルモンの作用時期、部位を解明するために、変態期における甲状腺ホルモンリセプターの発現動態を明らかにすることを試みた。そのために、第1には競合PCR法を利用して全身での総発現量を発育に伴って測定し、第2には *in situ hybridization* 法を用いて発現部位を特定した。まず競合PCR法を用いて、 $fTHR\alpha A$ と $fTHR\alpha B$ のmRNA量は個別に、 $fTHR\beta 1$ と $fTHR\beta 2$ のmRNAはその総和を測定できる方法を確認した。その方法を用いて受精卵から変態終了に至るまでの甲状腺ホルモンリセプターmRNAの発現量を測定したところ、いずれの甲状腺ホルモンリセプターのmRNAも受精卵中にはほとんど存在せず、孵化直後から数日後にかけて検出されるようになり、変態期の前半まではその発現量を維持した。その後、いずれの甲状腺ホルモンリセプター量も増加し変態の終了とともに減少した。発現のピーク値は2種の α 型甲状腺ホルモンリセプターの方が β 型のものより数日早く観察された。さらに、*in situ hybridization* 法を用いて、変態最盛期の仔魚での α 型と β 型の甲状腺ホ

ルモンリセプター mRNA の発現部位を調べた。α 型と β 型の甲状腺ホルモンリセプターの発現部位に明確な差異は認められず、双方ともほぼ全身のあらゆる部位にわたって発現が認められた。特に、皮膚、眼、筋肉、軟骨細胞、骨芽細胞などで強い発現があり、これら強い発現のみられた場所は、皮膚の有眼側と無眼側への分化、暗所への適応、骨化など変態期に特徴的な変化がみられる部位と一致していた。これらのことから、変態期には甲状腺ホルモンが同時平行的に様々な部位に直接的に作用し、組織・器官の発達を誘導することが強く示唆された。

本研究を通じて、変態期にヒラメの体側筋は、甲状腺ホルモンの作用で、仔魚型から稚魚型もしくは成魚型への質的な転換を遂げることが示された。加えて、胃の分化、原始赤血球（幼生型赤血球）から成体型赤血球への転換など、他の組織・器官でも著しい発達が起こっており、これらも甲状腺ホルモンによって制御されていることが知られている。これらのことを総合すると、変態の本質は、様々な組織・器官における仔魚型から稚魚型、成魚型への形態的・機能的な転換にあると考えられる。また、甲状腺ホルモンはその転換を誘導する役割を持つホルモンであると考えられる。

ヒラメに限らずあらゆる魚種において、仔稚魚期には種々の組織・器官が著しい発達をする。また多くの魚種

において、仔魚から稚魚への転換期には甲状腺ホルモンの分泌が高まっていることが知られている。従って、ヒラメの変態と他の魚種の仔稚魚期の発育過程の間に本質的な差異はなく、甲状腺ホルモンの仔魚から稚魚・成魚への体制変化を誘導する役割は、魚類に共通するものと推察された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	山崎文雄
副査	教授	西田清義
副査	教授	山内皓平
副査	助教授	後藤晃

学位論文題名

ヒラメの変態に関する発生学的・内分泌学的研究

ヒラメは、仔魚期から稚魚期への移行時に眼の移動、体形の扁平化、生活場所の変化などの顕著な変態現象を示すが、この時期には罹病する疾病の種類の変化、体色異常などが生じ、種苗生産の増大を計る上で、変態現象を理解することは極めて重要となっている。

申請者は、ヒラメの変態が脳下垂体－甲状腺系ホルモンによって誘導されることに注目し、ヒラメの変態期に起こる組織・器官の発達とそれに及ぼす甲状腺ホルモンの役割と作用経路を明らかにして、変態現象の理解に寄与することを目的として、本研究を行い、下記の評価すべき結果を得た。

1. 変態期の体側筋の発達過程を経時的に把握するために、筋組織を組織学的に観察して、変態前の仔魚の筋線維は細く、筋線維中に含まれる筋原線維の数も少ないが、変態期間中に筋組織は著しく発達し、筋原線維で充満した太い筋線維からなる成魚と同じ構造の筋組織になることを明らかにした。この現象は他種にみられる仔魚から稚魚への移行期にみられる共通の現象と推察され、ヒラメの変態現象の解明が仔魚から稚魚への移行現象の理解にも貢献するものとして極めて重要である。申請者は更に筋原線維蛋白について生化学的に調べ、変態期を境として種々の筋原線維蛋白の発現様態に顕著な消長のあることを明らかにした。特にミオシンでは、DTNB 軽鎖のLC2 にアイソフォームの転換が起こり、変態前の仔魚は成魚にない LC2* 成分を有するが、変態盛期に成体型アイソフォームの LC2 が出現し、これが漸次 LC2* にとって替わること明らかにした。また、トロポニンT では 5種類アイソフォームがあることを示し、それらは変態前の仔魚に特異的に存在するもの、変態期以降に出現するもの、変態前から変態以後も定常的に存在する 3タイプに大別できることを示した。これらの変態に伴う筋組織の組織学的変化や筋原線維の生化学的な一連の変化は甲状腺ホルモンの投与によって人為的に誘起できること、および、抗甲状腺ホルモン剤であるチオウレアの処理によって、これらの変化を抑制できることを実験的に証明するとともに変態終了後の筋組織の維持と筋原線維蛋白質の合成と発現には甲状腺ホルモンは必要のないことから、甲状腺ホルモンは、体制の変化そのものを主導的に導くことを明

確に示した。

2. 甲状腺ホルモンは、哺乳類において標的細胞の核内に存在する甲状腺ホルモンリセプターを介して作用することが知られており、甲状腺ホルモンが変態を誘起する場合、当然、甲状腺ホルモンリセプターが変態期のヒラメに多量に発現されていなければならない。そこで、申請者は変態期ヒラメの cDNA ライブラリーから甲状腺ホルモンリセプターをコードしている cDNA の単離を試み、3種類の甲状腺ホルモンリセプターの単離に成功し、これらの塩基配列を決定した。アミノ酸配列を他の動物由来の甲状腺ホルモンリセプターと比較して、3種類のうち2種は α 型、残り1種は β 型でこの β 型には20アミノ酸残基分長い以外は全く同じ塩基配列をもつ別の β 型リセプターのあることを示した。更にこれら4種類の甲状腺ホルモンリセプターの内 α 型2種は、各々異なった遺伝子座に支配され、 β 型2種は1つの遺伝子座に支配されていることを示し、甲状腺ホルモンリセプターをコードする遺伝子のゲノム中での存在様式を初めて明らかにした。

3. 競合PCR法を利用して、発育に伴う甲状腺ホルモンリセプターの全身での総発現量を測定し、更に in situ hybridization法を用いて、発現部位を特定した。その結果、4種類いずれの甲状腺ホルモンリセプターの mRNA も受精卵中に存在しないことを示し、卵内に貯えられている甲状腺ホルモンは機能していないことを示唆した点は注目に値する。しかし、4種類の甲状腺ホルモンリセプターのいずれの mRNA も受精数日して検出されるようになり、変態時には増加するが、変態後には再び減少することを明らかにし、甲状腺ホルモンリセプター量と変態との関連性を明確に示した。変態最盛期の仔魚での α 型と β 型の甲状腺ホルモンリセプターの発現部位については、 α 型と β 型とで明確な差はなく、双方とも全身のあらゆる部位にわたって発現するが、特に皮膚、眼、筋肉、軟骨細胞などで強い発現がみられ、これらの強い発現の部位は、変態期に特徴的な変化の見られる部位と一致することを明らかにした。これらの結果は、変態期に甲状腺ホルモンが同時平行的に様々な部位に直接作用し、体制の変化を誘起することを示すものである。

本研究は、ヒラメの変態の本質が様々な組織・器官の仔魚型から稚魚型、成魚型への形態的、機能的な転換にあり、甲状腺ホルモンはその転換を主導的に誘起する役割を担っていることを示すとともに、他の多くの魚種でみられる、仔魚から稚魚への体制変化も、ヒラメの変態と共通する現象であることを示唆して、魚類の種苗生産一般にも寄与する重要な知見を与えるものと評価した。よって審査員一同は、本論文が博士（水産学）の学位に相当する業績と判定した。