博士（理　学）　太　田　有　紀

学 位 論 文 題 名

Sexually Dimorphic Expression of Neurohypophysial Hormone Genes and Steroid Hormones in Salmonid

（サケ科魚類における神経葉ホルモン遺伝子の発現の雌雄差とステロイドホルモン）

学位論文内容の要旨

多くのサケ科魚類は海洋を回遊し，母川に帰ってきて産卵する．このような本能的な行動およびそれにともなう多くの生理現象は神経系と内分泌系によって制御されていると考えられている．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ると考えられており，神経葉ホルモンをはじめとする多くの神経ホルモンを産生している．神経葉ホルモンは魚類を含む多くの脊椎動物において浸透圧調節，生殖活動に関わっていることが示されており，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と考えられている．サケ科魚類の回遊は生殖活動と捉えることができ、また回遊にともない魚は異なる浸透圧環境を移動するので，回遊行動における神経葉ホルモンの役割に興味が持たれる．したがって回遊に伴うホルモン遺伝子の発現を解析することにより，回遊行動における神経葉ホルモンの生理的役割に関する手がかりが得られる可能性がある．

本研究ではまず母川回帰時のシロザケにおける神経葉ホルモン遺伝子の発現を形態学的な手法により解析した．次いで浸透圧の変化や性成熟の影響を避けるため淡水中で飼育されている未成熟なサクラマスを用いて神経葉ホルモンの遺伝子発現と血中性ステロイドホルモンの季節変動を解析した．最後に，母川回帰時のシロザケにおいて神経葉ホルモン遺伝子の発現と血中のステロイドホルモンの関連を解析した．

第１章：母川回帰時のシロザケ視索前核における神経葉ホルモン遺伝子の発現の雌雄差

魚類では神経葉ホルモンは視床下部の視索前核の神経内分泌細胞において産生される．視索前核はさらに比較的小さな細胞からなる前腹部，大きい細胞からなる中央部，さらに大きい細胞からなる後背部の３つの細胞集団に分けることができる．そのように大きさや存在位置の異なる細胞集団では細胞の活動やその制御が異なっている可能性があり，形態学的な手法による解析が必須となる．そこで母川回帰時のシロザケを用いて，神経葉ホルモン遺伝子の発現の変動を *in situ* ハイブリダイゼーション法および免疫組織化学法により解析した．

その結果，母川に遡上する直前の海水中の個体と最終成熟段階の個体を比べると，雄ではVT mRNAレベルに有意差がなかったのに対し，最終成熟段階の雌ではVT mRNAレベルが視索前核の３領域すべてで有意に減少しているという結果が得られた．以上の結果から最終成熟段階のシロザケでは神経葉ホルモンの遺伝子発現が雌雄で異なることが明らかとなり，雌雄で異なる発現調節を受けていることが示された．また，VT 遺伝子の発現の変動には部域差がなかったことから共通の神経入力あるいは液性因子による調節を受けている可能性が示唆された．

第２章：未成熟な雌サクラマスにおける神経葉ホルモン遺伝子発現の季節変動

魚は変温動物であり季節によって生理状態が変化し，神経葉ホルモン遺伝子の発現も季節変動している可能性がある．成熟時に見られた神経葉ホルモン遺伝子の発現の変動がそのような季節変動を反映していることも考えられる．したがって神経葉ホルモンの合成活動を解析する上では遺伝子発現の季節変動のような基礎的な情報が重要となる．

そこで未成熟なサクラマスの雌において神経葉ホルモン遺伝子の発現の変動を *in situ* ハイブリダイゼーション法および免疫組織化学法により解析した．また，血中の性ステロイドホルモン量を測定した．その結果，神経葉ホルモンの mRNA レベルおよび免疫染色性に季節変動が見られ，神経葉ホルモンの遺伝子発現が季節変動していることが明らかになった．性ステロイドホルモンは秋に上昇していた．このとき，VT mRNA レベルが上昇していたことから，VT 遺伝子の発現がステロイドホルモンの影響を受けていることが示唆された．

第 3 章：未成熟サクラマスの正常雄と早熟雄での神経葉ホルモン遺伝子発現の季節変動の違い

サクラマスは通常 3 歳魚の秋に成熟するが，多くの雄は 1 歳魚の秋に成熟することが知られている．そのような早熟雄と正常雄においては血中の性ステロイドホルモンレベルが異なると予想される．そこで，未成熟な正常雄と早熟雄において神経葉ホルモンの遺伝子発現と血中の性ステロイドホルモンレベルの季節変動を解析した．その結果，神経葉ホルモン遺伝子発現に季節変動が見られた．正常雄の変動パターンは雌のそれと異なっていた．このことから，神経葉ホルモン遺伝子の季節変動にも雌雄差があることが明らかとなった．また，早熟雄と正常な雄でも季節変動のパターンは異なっていた．正常雄では VT mRNA レベルが上昇している時期に血中性ステロイドホルモンレベルが高いことが明らかになった．一方，早熟雄では VT mRNA レベルと性ステロイドホルモン量の変動は必ずしも一致していなかった．これは正常雄と早熟雄では性ステロイドホルモンに対する感受性が異なるためと考えられる．また，秋に VT の mRNA レベルを雌雄で比べると雄のものよりも雌のものの方が高かった．これは成熟シロザケで得られた結果とは一致しない．このことから神経葉ホルモンの遺伝子発現の季節変動を調節している要因と最終成熟時のそれとは異なることが示唆された．

第 4 章：母川回帰時のシロザケにおける血中ステロイドホルモンと神経葉ホルモン遺伝子の発現の雌雄差

上記に述べた結果から，母川回帰時のシロザケにおいて神経葉ホルモン遺伝子の発現にステロイドホルモンが関わっていることが考えられる．そこで母川回帰時のシロザケにおける神経葉ホルモンの mRNA レベルの変動をドットブロットにより定量的に解析した．また血中の testosterone, estradiol, cortisol および 17α,20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) 量をエンザイムイムノアッセイにより測定した．その結果，母川に遡上する直前の海水中の個体，母川を遡上中の個体，最終成熟段階の個体を比べると，雄では神経葉ホルモンの mRNA レベルに有意差がなかったのに対し，最終成熟段階の雌では VT mRNA 量が有意に半分近くに減少しているという再現性のある結果が得られた．一方血中ステロイドホルモン量にも母川回帰に伴う変動が見られたが，特に最終成熟時に血中 DHP 量の急激な増加が見られた．DHP 量の増加は雌雄共に見られたが，最終成熟段階の雌の血中 DHP 量は雄に比べて 4 倍程度だった．これらのことから DHP が雌における VT 遺伝子発現の抑制に関わっていることが示唆された．

以上に述べた一連の研究により，神経葉ホルモン遺伝子の発現には雌雄差があることが明らかとなり，神経葉ホルモン遺伝子の発現がステロイドホルモンの影響を受けていることが示された．また，最終成熟時に VT 遺伝子発現を調節している要因は季節変動のそれとは異なることが示された．シロザケにおいて，最終成熟段階の雌で VT 遺伝子が低下する現象は異なる年に採集された魚で一貫して観察されたので，母川回帰時に普遍的に引き起こされる現象であると考えられる．また，最終成熟時のシロザケでは特に DHP レベルの上昇が顕著であり，VT 遺伝子発現の抑制に関わっていることが示唆された．VT 遺伝子発現の雌雄差は回遊行動の最終段階で見られたことから，この時期のシロザケでは VT は浸透圧調節よりも生殖活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

学位論文題名

Sexually Dimorphic Expression of Neurohypophysial Hormone Genes and Steroid Hormones in Salmonid

(サケ科魚類における神経葉ホルモン遺伝子の発現の雌雄差とステロイドホルモン)

多くのサケ科魚類は海洋を回遊し，母川に帰ってきて産卵する．このような本能的な行動およびそれにともなう多くの生理現象は神経系と内分泌系によって制御されていると考えられている．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ると考えられており，神経葉ホルモンをはじめとする多くの神経ホルモンを産生している．神経葉ホルモンは脊椎動物の浸透圧調節と生殖行動に関わっていることが示されており，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と考えられている．したがって回遊にともなうホルモン遺伝子の発現を解析することにより，回遊行動における神経葉ホルモンの生理的役割，さらには母川回帰の遺伝子プログラムの解明に関する手がかりが得られる可能性がある．

申請者は，まず，神経葉ホルモン産生細胞なる視床下部・視索前核における神経葉ホルモン mRNA 量の変動を細胞レベルで解析した．母川遡上直前の海水中の個体と最終成熟段階の個体を比べると，雄では VT mRNA レベルに有意差がなかったのに対し，最終成熟段階の雌では VT mRNA レベルが視索前核の 3 領域すべてで有意に減少していた．これにより，最終成熟段階のシロザケでは神経葉ホルモンの遺伝子発現が雌雄で異なること，また雌雄で異なる発現調節を受けていることが示された．

次いで，未成熟なサクラマスの雌雄において神経葉ホルモン遺伝子の発現の年周変動を *in situ* ハイブリダイゼーション法および免疫組織化学法により解析し，神経葉ホルモンの mRNA レベルおよび免疫染色性に季節変動が見られること，性ステロイドホルモンの年周変動がそれに対応していることを明らかにした．

さらに母川回帰時のシロザケにおける神経葉ホルモンの mRNA レベルの変動をドットブロットにより定量的に解析した．また血中の testosterone, estradiol, cortisol および 17α,20β-DHP 量をエンザイムイムノアッセイにより測定した．その結果，母川に遡上する直前の海水中の個体と比較すると，最終成熟段階の雌では VT mRNA 量が有意に半分近くに減少しており，その時血中 DHP 量の急激な増加が見られた．それにより DHP が雌における VT 遺伝子発現の抑制に関わっていることを示した．

以上に述べた一連の研究により，神経葉ホルモン遺伝子の発現には雌雄差があること，また神経葉ホルモン遺伝子の発現がステロイドホルモンの影響を受けていることが示された．また，最終成熟時に VT 遺伝子発現を調節している要因は季節変動のそれとは異なることが示された．最終成熟時のシロザケでは特に DHP レベルの上昇が顕著であり，VT 遺伝子発現の抑制に関わっていることが示唆さ

れた．VT 遺伝子発現の雌雄差は回遊行動の最終段階で見られたことから，この時期のシロザケでは VT は浸透圧調節よりも性行動に関与している可能性が示された．これらの成果は，回遊行動の遺伝子プログラムの制御にステロイドホルモンが関わっていることを明らかにしたもので，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，申請者は，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．