

学 位 論 文 題 名

Ultrastructural and molecular biological
studies on hormonal control of osmoregulation
in the gill of masu salmon during smoltification

（銀化変態期のサクラマス鰓における浸透圧調節のホルモン制御
に関する微細構造学および分子生物学的研究）

学位論文内容の要旨

サクラマスは本道で重要な沿岸漁業対象種となっているが、近年乱獲が進行しその天然資源が激減している。そのため、稚魚を河川および海洋に放流する事業が積極的に行われている。しかし、この放流魚の中に、スタント（成長しない魚）や死亡する個体が生じることから、必ずしもサクラマスの回帰率は上昇していない。このスタントおよび死亡の原因の一つには、海水適応能の発達が不十分なことが挙げられる。この問題を解決するためには、サクラマスの浸透圧調節機構に関する基礎的知見の集積が必要である。

一般に、サクラマスを含む降海型サケ科魚類には、コルチゾル、成長ホルモン、プロラクチンおよび甲状腺ホルモンをはじめとする複雑な内分泌制御のもと、降海前に河川で銀化変態（パーからスモルトへの変化）が起る。この銀化変態には、海水適応能の発達、体色の銀白化等の様々な変化が含まれる。このうち、海水適応能の発達で、淡水型から海水型への浸透圧調節機構の変化に関わる重要な細胞の一つが鰓塩類細胞（CC）である。しかし、これまで天然魚の銀化変態に伴うCCの動態を調べた報告は殆ど無く、さらにはCCの内分泌制御機構にも不明な点が多い。また、銀化変態を支配する内分泌制御機構をホルモンの受容体に着目し解明しようとした試みは僅かであり、銀化変態期におけるホルモン受容体の分子レベルでの動態も不明である。

そこで本研究では、サクラマス銀化変態期の鰓における浸透圧調節のホルモン制御機構を微細構造学的および分子生物学的に明らかにすることを目的として、1) 天然魚の銀化変態に伴う CC の微細構造変化、2) CC の微細構造に及ぼすホルモンの影響、3) 天然魚の銀化変態に伴うコルチゾル受容体であるグルココルチコイド受容体 (GR) mRNA の鰓における発現変化、4) 鰓 GR mRNA の発現に及ぼすホルモンの影響を調べた。

まず、銀化変態に伴う CC の微細構造変化を調べるために、パーからスモルトまでの天然サクラマスから鰓を採集し、透過型電子顕微鏡による観察に供した。その結果、全ての個体に1次鰓弁上で、微細構造学的に2型 (α 型および β 型) の CC および未成熟型 α 細胞と推察される Accessory cell が観察された。 α 細胞および Accessory cell は2次鰓弁基部に位置し、血管と隣接し低い電子密度を有するのに対し、 β 細胞は2次鰓弁間に位置し、血管と隣接せず高い電子密度を有していた。 α 細胞では、基底部側部細胞膜である tubular system の発達のピークがフルスモルトの5月に、粗面小胞体 (er) およびゴルジ体の発達のピークがプレスモルトの3月および4月に観察され、その細胞数は銀化変態に伴い増加し5月にピークに達した。このうち、tubular system の発達および細胞数の増加は鰓 Na^+, K^+ -ATPase 活性の上昇が示す海水適応能の発達と同調していた。また、 β 細胞では銀化変態に伴い、細胞内に微細構造変化は観察されなかったものの、その数は有意に減少した。さらに、1次鰓弁基底部に、幼弱型 CC と推察される細胞が銀化変態の進行に伴い多数出現するのが観察された。一方、2次鰓弁上では、微細構造学的に1次鰓弁上の α 細胞に相当する CC のみが観察された。2次鰓弁上の CC では、銀化変態に伴い α 細胞と同様の微細構造変化が観察されたが、その数は α 細胞と異なり減少した。これらの結果から、天然降海型サケ科魚類の銀化変態に伴う CC の微細構造変化が初めて明らかとなった。また、海水適応能の発達には、2次鰓弁基部における α 細胞の発達が最も重要だと考えられた。

次に、銀化変態に伴う CC の微細構造変化に関わる内分泌制御機構を明

らかにするため、ホルモンの生体内投与実験を行い、サクラマスの CC の微細構造に及ぼすホルモンの影響を調べた。供試魚には池産魚パーを用い、コントロール、ヒツジ成長ホルモン (oGH) 投与群、コルチゾル投与群、ヒツジプロラクチン (oPRL) 投与群および甲状腺ホルモン投与群を設けた。投与終了後に全群から鰓を採集し、透過型電子顕微鏡による観察に供した。その結果、全群の魚で、1次鰓弁上に α 細胞、 β 細胞および Accessory cell が、2次鰓弁上には α 細胞に相当する CC のみが観察された。 α 細胞および2次鰓弁上の CC において、tubular system の発達は oGH 投与により、er およびゴルジ体の発達はコルチゾル投与により、これらの細胞数の増加が oGH およびコルチゾル双方の投与により誘導された。また、 β 細胞数の減少は oGH 投与により、1次鰓弁基底部で多数の幼弱型 CC の出現がコルチゾル投与により誘導された。以上の結果から、銀化変態に伴う CC の微細構造変化が主に成長ホルモンおよびコルチゾルにより制御されていることが示された。

銀化変態に伴う鰓 GR mRNA の発現変化を調べるため、競合的 PCR 法を用いた鰓 GR mRNA の高感度測定系の確立を試みた。競合的 PCR に用いるプライマーには、既知のニジマス GR cDNA の塩基配列から GR のみが特異的に増幅される領域を選択した。競合体には、人為的に作製したサクラマス β -actin cDNA 断片を含む全長 360 bp の DNA を用いた。サクラマス鰓 total RNA 1 μ g を逆転写した試料を鋳型に、サクラマス GR cDNA 断片および競合体の PCR における競合性を検討した結果、その両者は互いに競合性を示した。この結果から、本測定系がサクラマス鰓 GR mRNA の測定に有効であることが示された。

確立された本測定系を用い、天然サクラマスの銀化変態に伴う鰓 GR mRNA の発現変化を調べた。その結果、鰓 GR mRNA の発現量は3月のプレスモルトの時期から徐々に増加し、4月にピークに達し（3月の約4倍）、海水適応能が最も発達するフルスモルトの5月に既に減少傾向を示した。また、銀化変態に伴う血中ホルモン量の変化を調べたところ、GH量は2月のパーの時期から上昇し、3月に最も高値を示し、その後減少したのに対し、コルチゾル量は1月のパーの時期から3月まで低値を示し、

4月に急増しピークに達し、5月に減少傾向を示した。以上の結果から、天然サクラマス銀化変態に伴う鰹 GR mRNA の発現変化が明らかとなった。この変化は血中コルチゾル量の変化に酷似しており、GR mRNA の発現がコルチゾルのポジティブフィードバックの制御を受けている可能性が考えられた。

最後に、サクラマスの鰹 GR mRNA の発現に関わる内分泌制御機構を明らかにするため、ホルモンの生体内投与実験を行い、鰹 GR mRNA の発現に及ぼすホルモンの影響を調べた。供試魚には、池産パー、プレスモルト、フルスモルトおよびポストスモルトを用い、コントロール、oGH 投与群、コルチゾル投与群、oGH + コルチゾル複合投与群を設けた。投与終了後に全群から鰹を採集し、先に確立した測定系を用い鰹 GR mRNA の発現量の測定を行った。その結果、鰹 GR mRNA の発現量はパーのコルチゾル投与群、プレスモルトの oGH、コルチゾルならびに複合投与群、ポストスモルトの oGH および複合投与群で有意に増加した。これらの結果から、銀化変態期に観察される GR mRNA の発現量の増加には全期間を通じ、主にコルチゾルが、プレスモルトの時期以降に GH が作用していると考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	山内	皓平
副査	教授	麦谷	泰雄
副査	教授	原	彰彦
副査	助教授	上田	宏
副査	助教授	足立	伸次

学位論文題名

Ultrastructural and molecular biological studies on hormonal control of osmoregulation in the gill of masu salmon during smoltification

(銀化変態期のサクラマス鰓における浸透圧調節のホルモン制御に関する微細構造学的および分子生物学的研究)

近年、本道ではサクラマスの乱獲が進行しその天然資源が激減していることから、サクラマス稚魚の放流事業が積極的に行われている。しかし、この放流する稚魚の中にスタント（成長しない魚）や死亡個体が生じることから、必ずしもサクラマスの回帰率上昇には至っていない。このスタントおよび死亡の原因の一つには、海水に適応するための浸透圧調節能の発達が不十分なことが挙げられる。この問題を解決するためには、サクラマスの浸透圧調節機構に関する基礎的知見の集積が必要である。

サクラマスを含む降海型サケ科魚類には、降海前に河川で複雑な内分泌制御のもと、銀化変態が起こる。この銀化変態には、海水適応能の発達、体色の銀白化等の様々な変化が含まれる。このうち、海水適応能の発達において、浸透圧調節機構の変化に関わる重要な細胞の一つが鰓塩類細胞（CC）である。しかし、これまで天然魚の銀化変態に伴うCCの動態を調べた報告は無く、さらにはCCの内分泌制御機構にも不明な点が多い。また、銀化変態を支配する内分泌制御機構をホルモンの受容体に着目し解明しようとした試

みは僅かであり、銀化変態期におけるホルモン受容体の分子レベルでの動態も不明である。

そこで、本研究は先ず天然サクラマス銀化変態に伴う CC の微細構造変化を調べた。その結果、一次鰓弁上には α および β の 2 型の CC が、2 次鰓弁上には α 型に相当する細胞のみが存在することが明らかとなった。また、銀化変態に伴い大きな微細構造変化が観察されるのは 2 次鰓弁基部における CC であり、これらの細胞の発達が本種の海水適応能の発達に最も重要だと考えられた。

次に、CC の内分泌制御機構を調べるため、CC の微細構造に及ぼすホルモンの影響を調べた。その結果、 α 細胞および 2 次鰓弁上の CC において、成長ホルモン (GH) は tubular system の発達を、コルチゾルは粗面小胞体およびゴルジ体の発達を誘導すると考えられた。また、コルチゾルはこれらの作用に加え、1 次鰓弁基底部で CC の分化に作用していると推察された。

さらに、コルチゾルの作用機構を明らかにするため、銀化変態に伴う鰓グルココルチコイド受容体 (GR) mRNA の発現変化を調べた。その結果、鰓 GR mRNA の発現量は 3 月のプレスモルトの時期から徐々に増加し、4 月にピークに達し (3 月の約 4 倍)、海水適応能が最も発達するフルスモルトの 5 月に既に減少傾向を示した。この変化は血中コルチゾル量の変化に酷似しており、GR mRNA の発現がコルチゾルのポジティブフィードバックの制御を受けている可能性が考えられた。

最後に、サクラマスの鰓 GR mRNA の発現に関わる内分泌制御機構を明らかにするため、鰓 GR mRNA の発現に及ぼすホルモンの影響を調べた。その結果、鰓 GR mRNA の発現量の増加には銀化変態期の全期間を通じ、主にコルチゾルが、プレスモルトの時期以降に GH が作用していると考えられた。

上述のように、本研究はサクラマスの浸透圧調節機構に関して微細構造学および内分泌学的側面から基礎的知見を提供した。今後、これらの知見はサクラマス仔魚の放流事業に応用可能と考えられることから、高く評価され、本論文が博士 (水産学) の学位請求論文として相当の業績であると認定した。