

学 位 論 文 題 名

Roles of Gonadotropin-Releasing Hormone
in Homing Migration and Sexual Maturation
of Pre-Spawning Salmonids

(サケ科魚類の母川回帰行動と性成熟における
生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンの役割)

学位論文内容の要旨

多くのサケ科魚類は、生まれた川（母川）をくだって海洋を回遊する。特にシロザケの回遊は何千キロにもおよび、3-5 年かけて北洋水域で成長したのち、カムチャッカ半島にそって南下して母川のある日本沿岸に近づく。母川の河口付近にたどり着いたサケは匂いを手がかりに母川を遡上すると共に性成熟を進行させ、産卵場に達する。このようなサケの母川回帰行動は本質的に繁殖のための本能行動であると考えられるので、その制御は神経内分泌系によって行われていると考えられる。したがって、性成熟をコントロールする神経ホルモンである生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）や性成熟にともない生殖腺で産生される性ステロイドホルモンが母川回帰行動に関わっている可能性が大きいと考えられる。

本研究では、まず母川に近づいてからのサケの行動パターンを解明するため、データロガーを用いて石狩湾で行動解析を行った。ついで母川への遡上行動の動機付けに関わるホルモンの同定のため、湖でのヒメマスを用いたモデル実験を行ったのち、実際に GnRH によってシロザケの遡上行動が促進されるかを調べた。同時に GnRH の下垂体-生殖腺系への作用を確かめるため、母川回帰にともなうシロザケ下垂体での生殖腺刺激ホルモン（GTH）のサブユニット mRNA 量の変動を調べ、さらに成熟途上のベニザケへの GnRH アナログ（GnRHa）投与実験を行った。最後に周年に渡って試料が得られるサクラマスモデル系として、下垂体における GnRH 感受性の季節変動を調べた。

第 1 章：マイクロデータロガーを用いた石狩湾におけるシロザケの行動解析

シロザケが母川に近づいたときにどのような行動パターンをとっているかについてはまだ報告が少なく、主なフィールドとする石狩湾で実際にシロザケがどのように行動しているのかを調べる必要があった。そこで水温データや水深データを同時記録できるマイクロデータロガーを沿岸で捕獲したシロザケに装着し、石狩湾でどのような遊泳行動をとっているかを調べた。遊泳範囲の特定には衛星観測による海表面温度分布データ等を用いた。その結果、石狩湾に回帰してきたシロザケは表層に近い水温が低いところを泳いでいた。このとき、海表面温度分布などのデータは、河川水が流れ込むことで、石狩川河口に近い沿岸表層付近に冷たい汽水域が形成されていることを示していた。表層付近への滞在は、サケが低水温を選択した結果だと考えられる。また、たとえ河口近くで放流されてもほとんどの個体が数日以内に再び沿岸の定置網で捕獲された。したがって、石狩湾のシロザケは遡上行動の動機付けが完了されるまで沿岸を泳ぎ回り、その際には低水温を好んで河口付近のごく表層に近いところにいると考えられる。

第2章：GnRH および性ステロイドの投与によるヒメマス母川回帰の促進

湖におけるヒメマスの母川回帰行動は、シロザケの沿岸から母川への遡上行動に対応していると考えられる。そこで、支笏湖のふ化場近くに回帰してきたヒメマスを捕獲し、GnRHa および性ステロイドの投与後に湖の中央に放流して、ふ化場への再回帰にかかる日数を調べた。その結果、特に GnRHa を投与されたヒメマスは再回帰に要する日数が雌雄ともに対照群のおよそ半分に短縮され、GnRH がサケの母川回帰行動に関わっていることが示唆された。

第3章：GnRH によるシロザケの母川遡上行動促進効果

上記の結果を基に、石狩湾に回帰してきたシロザケに GnRHa を投与して放流し、石狩川上流の産卵場までの遡上に要する日数を調べた。対照群は産卵場までの遡上におよそ 16 日間かかったが、GnRHa 投与群はわずか 9 日間で産卵場までの遡上を終えた。この結果は GnRH がシロザケの海から母川への遡上行動を促進していることを示している。また、GnRHa 投与群では沿岸の定置網で再捕されずに産卵場まで遡上した魚の割合が対照群に比べて大きかったことから、脳内に広く投射している GnRH ニューロンがシロザケの海から母川に入る動機付けを行っている事も示唆された。

第4章：母川回帰にともなうシロザケ下垂体での GTH サブユニット mRNA 量の変動

上記に述べた結果から、GnRH がサケの母川回帰行動に関わっていることが示された。そこで母川回帰時のシロザケにおける GnRH の下垂体－生殖腺系への作用を調べるため、GTH I および GTH II を構成する 2 つのサブユニット (α と β) の下垂体中 mRNA 量の変動を調べた。 α サブユニット ($\alpha 2$) はそれぞれの GTH に共通で、ホルモント異的な $\text{I}\beta$ もしくは $\text{II}\beta$ サブユニットと二量体を形成している。ドットプロット法を用いて定量した結果、産卵場の魚では $\alpha 2$ と $\text{II}\beta$ の mRNA 量が沿岸の個体よりも高い値を示した。沿岸から産卵場までの間で脳内の GnRH mRNA 量が増加するという報告があることから、母川回帰にともなって脳内の GnRH 合成・放出が増加し、それによって GTH II を構成する $\alpha 2$ と $\text{II}\beta$ サブユニットの遺伝子発現が促進されることが示唆された。

第5章：GnRHa 投与による成熟途上のベニサケでの GTH II 遺伝子発現の促進

上記の実験結果を受け、成熟途上のベニサケを用いて GnRHa の投与実験を行った。3 週間の実験期間の間に、対照群ではシロザケで見られた結果と同様の GTH II サブユニット mRNA 量の増加傾向が認められた。GnRHa 投与群では雌雄共に対照群に比べて著しく GTH II サブユニット mRNA 量が増加する一方で GTH $\text{I}\beta$ の mRNA 量には変化が見られず、最終成熟が促進された。この結果は、GnRH が成熟途上期のサケで GTH II の遺伝子発現のみを促進し、その結果最終成熟を促進していることを示している。

第6章：GTH 遺伝子発現の GnRH 感受性の季節変動

GTH II 遺伝子発現がどの時期に GnRH への感受性を獲得するのかという疑問に答えるため、成長を追ってサンプリングが可能な池産のサクラマスモデル系として GnRHa 投与実験を毎月 1 回、1 年半に渡って行った。また、GnRH による発現促進が特定のホルモン遺伝子にだけ見られるのかどうかを調べるため、GTH と同じ下垂体糖タンパク質ホルモンで GTH と α サブユニットを共有する甲状腺刺激ホルモン (TSH) の β サブユニットの mRNA 量も測定した。その結果、GSI の上昇が始まる 6 月から 7 月に $\alpha 2$ および GTH $\text{II}\beta$ をコードする遺伝子発現の GnRH 感受性が高まることが分かった。この時期は北洋からシロザケが母川回帰を始めると言われる時期でもあることから、脳内の GnRH ニューロンの投射を受けたニューロンでも同時に GnRH 感受性が増加している可能性が考えられる。

以上に述べた一連の研究により、GnRH がサケの母川回帰行動を促進しており、同時に下垂体における GTH II の合成を 6 月から 7 月にかけて特異的に促進して最終成熟を誘起していることが明らかとなった。サケの繁殖の成功は、ここで確かめられたような GnRH による神経系と内分泌系の同調的支配によって導かれるのであろう。母川回帰行動には、血中性ステロイドホルモン濃度の上昇による中枢へのフィードフォワードが関わっている可

能性も考えられる。また、複数のサケ科の魚で GnRH による GTH II 遺伝子の発現制御が時間系列的に同じであることから、サケ属には繁殖に関わる共通の遺伝子プログラムが存在していると考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浦 野 明 央
副 査 教 授 高 畑 雅 一
副 査 教 授 片 倉 晴 雄
副 査 助 教 授 伊 藤 悦 朗

学 位 論 文 題 名

Roles of Gonadotropin-Releasing Hormone in Homing Migration and Sexual Maturation of Pre-Spawning Salmonids

(サケ科魚類の母川回帰行動と性成熟における
生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンの役割)

サケ属魚類は、母川をくだって海洋を回遊する。シロザケの回遊は何千キロにもおよび、3-5年かけて北洋で成長したのち、カムチャッカ半島にそって南下して母川のある日本沿岸に近づく。母川の河口付近にたどり着いたサケは匂いを手がかりに母川を遡上するとともに性成熟を進行させ、産卵場に達する。このようなサケの母川回帰行動は本質的に繁殖のための本能行動であり、その制御は神経内分泌系によって行われているので、性成熟を調節する神経ホルモンである生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) や生殖腺で産生される性ステロイドホルモンが母川回帰行動に関わっている可能性が大きい。

申請者は、まず母川に近づいてからのサケの行動パターンを解明するため、データロガーを用いて石狩湾で行動解析を行った。ついで母川への遡上行動の動機付けに関わるホルモンの同定のため、支笏湖でヒメマスを用いたモデル実験を行ったのち、GnRHによってシロザケの石狩川への遡上行動が促進されるかを調べた。また、GnRHの下垂体-生殖腺系への作用を確かめるため、母川回帰にともなうシロザケ下垂体中の生殖腺刺激ホルモン (GTH) サブユニット mRNA 量の変動を調べ、さらに成熟途上のベニザケへの GnRH アナログ投与実験を行った。最後に周年に渡って試料が得られるサクラマスモデル系として、下垂体における GnRH 感受性の季節変動を調べた。

以上に述べた一連の研究により、GnRH がヒメマスおよびシロザケの母川への遡上行動を促進していること、それとともに、母川を遡上している最終成熟期のシロザケの下垂体では産卵場近くで下垂体における GTH II サブユニット遺伝子の発現レベルが高まること、最終成熟期に近いベニザケでも同様の遺伝子発現レベルの上昇が見られることが明らかになった。ベニザケへの GnRH アナログの投与実験から、さらに、GnRH がビテログニンの合成を促進する GTH I ではなく、最終成熟を促進する GTH II のサブユニット遺伝子の発現を促進することが明らかになった。このようにして、GnRH が中枢神経系に作用して遡上行動を促進する一方で、下垂体における GTH II の合成を高めることにより最終成熟を誘起していること、すなわち GnRH による神経系と内分泌系の同調的支配がサケの繁殖の成功を導くことを示した。続けて行ったサクラマス下垂体における GnRH 感受性の季節変動を調べる実験では、GTH II 遺伝子の発現がどの時期に GnRH への感受性を獲得するかを明らかにするため、成長を追って GnRH_a 投与実験を毎月 1 回、1

年半に渡って行い、生殖腺・体重重量比（GSI）の上昇の始まる6月末から7月に $\alpha 2$ およびGTH II β サブユニットをコードする遺伝子発現のGnRH感受性が高まり始めることを明らかにした。北洋のシロザケはこの時期に母川回帰を始めるので、サクラマスで得られた結果は、脳内のGnRHニューロンの投射を受けたニューロンでもこの時期に同時にGnRH感受性が増加している可能性を示すものである。

以上の研究成果は、産卵回遊の制御機構を理解するための基本的な概念を示すものである。とくに、神経系により制御される行動と内分泌系により調節される生殖腺の成熟が、GnRHによって同調的に支配されているという仮説は、本能行動の制御機構の理解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。