

学位論文題名

The gonadotropin-releasing hormone
and *fushi tarazu* factor 1: their roles
in the brain-pituitary axis of pre-spawning salmon

(サケの母川回帰における生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンと
fushi tarazu factor 1 の脳-下垂体系での役割)

学位論文内容の要旨

サケの性成熟は北洋から母川へ戻る際に、母川の産卵場において最終性成熟を迎えるように厳密に制御されている。この数千キロにもおよぶ道のりのなかで、サケがどのように自身の場所を把握し、性成熟を調節しているのかはまだよくわかっていない。生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (Gonadotropin-releasing hormone, GnRH) と転写因子 Steroidogenic factor 1 (SF-1) は、この性成熟を制御する脳-下垂体-生殖腺を軸とする内分泌系において重要な役割を持つ。性成熟の引き金となるのは種々の環境要因、例えば日長、水温、海流などの変化であるが、GnRH ニューロンは脳においてこれらの情報を統合し、下垂体ホルモンの合成、分泌を調節している。また、GnRH は生殖腺の発達のみならず、生殖行動や嗅神経、視神経の感受性も制御していることが他の脊椎動物で知られている。一方、SF-1 は哺乳類におけるシヨウジョウバエ *fushi tarazu* factor 1 (FTZ-F1) のホモログで、生殖腺でのステロイド合成酵素遺伝子の発現や下垂体での生殖腺刺激ホルモン (GTH) サブユニット遺伝子の発現に不可欠である。したがって、サケの性成熟および回帰行動を理解する上で、GnRH および FTZ-F1 遺伝子の発現がいつ、どのように制御されているのかを知ることは極めて重要である。

本研究では、まずサクラマスの子サケ GnRH (salmon GnRH, sGnRH) の遺伝子とその上流域を解析した。次いで FTZ-F1 遺伝子の発現がサケ科魚類の性成熟において、どのように変動するか、そしてそれは GnRH による制御を受けるのかを調べた。最後に母川回帰時のシロザケにおいて脳内各領域での sGnRH 遺伝子の発現変動を解析した。

第 1 章：サクラマスの sGnRH 遺伝子とその上流域の構造解析

倍加した染色体を持つサケ科魚類では、同一の分子種に対して 2 つの遺伝子が存在する。したがって母川回帰時における sGnRH 遺伝子発現の制御機構を正確に知るためには、2 つの sGnRH 遺伝子とその転写調節領域を調べる必要がある。そこで、サクラマスから 2 種類の sGnRH 遺伝子 (sGnRH-I, sGnRH-II) とその上流域を単離し、その構造を解析した。

2 つの sGnRH 遺伝子はよく保存されたコーディング領域と大きく異なる遺伝子上流域を持つことがわかった。なかでも、sGnRH-II 遺伝子上流域に見られた特徴的な約 1.2 kb の回文構造が、sGnRH-I 遺伝子では完全に欠落していた。この回文構造には Estrogen receptor 結合配列があるため、Estrogen による sGnRH-II 遺伝子の転写調節が予想される。一方、sGnRH-I 遺伝子上流域には、sGnRH-II 遺伝子で見られたものとは異なる 3 つの回文構造が見つかった。sGnRH-I と sGnRH-II 遺伝子上流域を Harr plot 法により比較した結果、上流域でみられる低い相性は、これら回文構造の挿入によって引き起こされた可能性が示された。これは、他の生物種において報告されている、トランスポゾンによる遺

伝子プロモーターのシャッフリングによく似ている。唯一比較的連続して相同性が見られたのは、転写開始点から約 200 bp 上流までであるが、これは基本的な遺伝子転写に必須な領域だと考えられる。

第 2 章：サケ科魚類の性成熟に伴うサケ *fushi tarazu factor 1* (FTZ-F1) ホモログ遺伝子の発現変動

母川回帰時のシロザケの下垂体では生殖腺刺激ホルモン(GTH)-II を構成する α 鎖および $\text{II}\beta$ 鎖両方のサブユニット遺伝子の発現が増加する。しかし、この上昇がどのように調節されているのかはまだよくわかっていない。そこで、まず石狩川に母川回帰したシロザケを河口沿岸、河川中流さらに孵化場で採取し、これら成熟度の異なるグループの下垂体でのサケ FTZ-F1 ホモログ (sFF1-I) 遺伝子の発現量を比較した。次に、この下垂体での sFF1-I 遺伝子発現に GnRH が関わっているのかを調べるため、成熟したベニザケを用いて、GnRH アナログ投与群と非投与群でその発現量を比べた。sFF1-I mRNA 量は RNase protection assay で定量的に測定した。

sFF1-I 遺伝子の発現は、母川回帰時のシロザケにおいて、最終性成熟に至る前の段階の河川中流のグループで上昇し、孵化場のグループでは下がっていることがわかった。この変動は GTH α と $\text{II}\beta$ 遺伝子の発現にも共通するものであった。また、ベニザケでは、sFF1-I 遺伝子の発現は最終性成熟前の個体では増加していたが、GnRH アナログの投与によるさらなる上昇は見られなかった。この時、GTH α と $\text{II}\beta$ 遺伝子の発現は GnRH アナログ投与によってさらに上昇した。したがって、サケ科魚類の性成熟では、sFF1-I は最終性成熟前のステージで GTH α および $\text{II}\beta$ サブユニット遺伝子の発現を増加させ、GTHII による最終性成熟を促していることが示唆された。そして、GnRH は sFF1-I 遺伝子の発現には影響を与えないことが明らかになった。

第 3 章：母川回帰時のシロザケにおける sGnRH mRNA 量の脳内部域特異的変動

sGnRH ニューロンは嗅球から視床下部にかけて広く分布している。これまでの *in situ* hybridization 法を用いた研究から、性成熟に伴い終脳腹側部 (ventral telencephalon, VT) および視索前野の sGnRH ニューロンで sGnRH 遺伝子の発現上昇が見られることがわかっている。しかし、この時 2 つの sGnRH 遺伝子がそれぞれどのような発現変動をするのかは全くわかっていない。また、sGnRH 遺伝子の発現上昇が最終性成熟のどのステージで起こるのかも不明である。そこで、1997 年と 1998 年に石狩川に母川回帰したシロザケの脳を凍結切片法により 10 箇所領域に分け、それぞれの領域中の sGnRH mRNA 量をリアルタイム PCR 法によって定量した。

脳内の各部位で sGnRH-II mRNA が sGnRH-I mRNA よりも約 5 倍多く存在していることがわかった。また、terminal nerve ganglion (TNG), VT と nucleus preopticus parvocellularis anterioris (PPa) それぞれを含む領域が、一致した sGnRH 遺伝子の発現変動を示した。この時、上記の 3 領域において、雄では 1997 年、1998 年ともに排精直前のステージで sGnRH mRNA 量が急激な上昇を示した。一方、雌ではその変動が緩やかで、1997 年には排卵した個体で最大値を示したが、1998 年には河口沿岸ですでに高い発現量を示し、それ以上の上昇は見られなかった。これは、1998 年の河口沿岸の個体で成熟が進んでいたことと関連していると考えられる。これらの結果は、脳内に広く分布する sGnRH ニューロンのうち、TNG, VT, PPa 領域の sGnRH ニューロン群が協働し、サケ母川回帰時の最終性成熟を調節していることを示唆している。

以上に述べた一連の研究により、sGnRH と sFF1-I がサケ母川回帰時の性成熟において重要な役割を果たしていることが示された。この時、sGnRH, sFF1-I 両遺伝子の発現変動が上昇の時期およびその雌雄差ともに共通な傾向を示したことは興味深い。すなわち、sGnRH, sFF1-I 両遺伝子とも最終性成熟直前の雄において顕著な発現上昇が見られ、成熟が進むと発現が減少した。一方、雌においては sGnRH, sFF1-I 両遺伝子とも発現の上昇が緩やかで、最終性成熟を終えた個体においてもその発現レベルが維持されていた。このことは、GTHII β 遺伝子の発現が雌雄ともに河川中流で増加するが、雄では最終性成熟を終えた個体で減少し、雌ではそのレベルが維持されることと一致する。したがって、

sGnRH と sFF1-I は，共通の因子例えばステロイドホルモンなどによる遺伝子発現制御を受けながら，GTHII による最終性成熟のタイミングを決めている可能性が高い。

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 助 教 授 伊 藤 悦 朗
副 査 助 教 授 田 中 実

学 位 論 文 題 名

The gonadotropin-releasing hormone and *fushi tarazu* factor 1: their roles in the brain-pituitary axis of pre-spawning salmon

(サケの母川回帰における生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンと
fushi tarazu factor 1 の脳-下垂体系での役割)

サケの性成熟は北洋から母川へ戻る際に、母川の産卵場において最終性成熟を迎えるように厳密に制御されている。生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(Gonadotropin-releasing hormone, GnRH) と転写因子 Steroidogenic factor 1 (SF-1)は、この性成熟を制御する脳-下垂体-生殖腺を軸とする内分泌系において重要な役割を持つ。性成熟の引き金となるのは種々の環境要因、例えば日長、水温、海流などの変化であるが、GnRH ニューロンは脳においてこれらの情報を統合し、下垂体ホルモンの合成、分泌を調節している。また、GnRH は生殖腺の発達のみならず、生殖行動や嗅神経、視神経の感受性も制御している。一方、SF-1 は哺乳類におけるショウジョウバエ *fushi tarazu* factor 1 (FTZ-F1) のホモログで、生殖腺でのステロイド合成酵素遺伝子の発現や下垂体での生殖腺刺激ホルモン(GTH)サブユニット遺伝子の発現に不可欠である。したがって、サケの性成熟および回帰行動を理解する上で、GnRH および FTZ-F1 遺伝子の発現がいつ、どのように制御されているのかを知ることは極めて重要である。

申請者は、まずサクラマスの子サケ GnRH (sGnRH) の遺伝子とその上流域を解析した。四倍体のサケ科魚類には、同一の分子種に対して2つの遺伝子が存在することを反映して、sGnRH-I および sGnRH-II 2種類の遺伝子が取れたので、sGnRH 遺伝子の発現制御機構を正確に知るために、両者の構造を解析した。2つの sGnRH 遺伝子はよく保存されたコーディング領域と大きく異なる遺伝子上流域を持っていた。大きな違いは sGnRH-II 遺伝子上流域に見られた特徴的な約 1.2 kb の回文構造で、sGnRH-I 遺伝子ではこれが完全に欠落していた。相同性が見られたのは、基本的な転写に必須な領域だと考えられる転写開始点から約 200 bp 上流までであった。続いて、申請者は、母川回帰時のシロザケの脳内における sGnRH mRNA 量の部域特異的な変動のリアルタイム PCR 法によって解析し、転写調節領域のこのような構造の違いによって、sGnRH-II 遺伝子の発現レベルが sGnRH-I 遺伝子のそれよりも数倍高いという違いを生じていること、それにもかかわらず両者の発現レベルの変動パターンには違いがないことを明らかにし、転写調節領域の機能的役割分担を示した。また、最終成熟時の雌雄の脳内では、sGnRH-I および sGnRH-II 両方の遺伝子の発現量が終脳腹部および視索前野で、下垂体の生殖腺刺激ホルモン遺伝子の発現レベルの上昇に対応して顕著に高まっていることを明らかにし、これらの領域が最終成熟の調節に重要であることを示し

た。さらに、サケ科魚類の性成熟では、FTZ-F1 は最終成熟前のステージで生殖腺刺激ホルモン遺伝子の発現を増加させ最終性成熟を促していること、しかし、GnRH は sFF1-I 遺伝子の発現には影響を与えないことを明らかにした。

以上に述べた一連の研究成果は、視床下部一下垂体系が最終成熟というサケのライフサイクルの中でも重要な現象を調節している機構の分子レベルでの理解を大きく進展させたものであり、サケ科魚類のみならず脊椎動物の生殖を分子生物学的な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。