

学 位 論 文 題 名

Releaser pheromones in the urine of *Oncorhynchus* species

サケ属魚類の尿中リリーサーフェロモン

学位論文内容の要旨

魚類の繁殖に関連する化学物質としての性フェロモンは、内分泌に影響を与える「プライマーフェロモン」と行動を誘起する「リリーサーフェロモン」に分けられて研究が進められてきた。これまでキングョを中心としたコイ目等では、それらの同定がなされ、配偶者誘引と産卵の同調性における役割が明らかにされてきた。一方、サケ科魚類における性フェロモンは、排卵したメスの体腔液に存在すると考えられてきたが、排卵メスから体腔液を得る場合、従来の採取方法では尿と混合する可能性が指摘され、結論は得られていない。近年、排卵メス尿に含まれるホルモン様活性物質、特に性ステロイドとFタイプ-プロスタグランジン（PGFs）がプライマーフェロモンとして作用することが報告されてきたが、リリーサーフェロモンに関しては、物質を同定した報告は乏しく、その由来、放出時期、生態的役割について未だ十分な知見は得られていない。

本研究では主にサクラマスとニジマスを用い、サケ属のリリーサーフェロモンに関して、（1）尿中フェロモンの存在、（2）フェロモンの受容と分泌に対する性ステロイドの関与、（3）フェロモンの種特異性、（4）フェロモンの化学的性状、（5）成熟雌雄の腎臓の変化、について明らかにすることを目的とした。

繁殖期にオスの行動に影響を与える化学物質が尿中に存在するか否かをサクラマスを用いた行動実験によって調べた。新たに開発したカテーテルにより採取した成魚の尿とY字選択水路を用い、尿又はその画分で匂いづけされた水路に対する河川型オスの移動頻度を記録した。その結果、排精している早熟オスは排卵メス尿に誘引され、一方、未成熟メス、未成熟オス、成熟オスの尿は、オスを誘引しなかった。また、排精前のオスや未成熟オスは排卵メス尿に誘引されなかった。排卵メスの体腔液にもオスを誘引する効果は認められなかった。未熟オスは成熟オス尿を忌避した。以上の結果から、成熟雌雄の尿は成熟オスの行動に影響を与えるフェロモン様物質を含むことが明らかになった。

メスが出すフェロモン様物質の受容と分泌は性ステロイド支配下にあることを行動実験によって検証した。サクラマスとニジマスにおいて、メチルテストステロン (MT, 10ppm) を3-4週間経口投与された未成熟魚は、排卵メス尿に誘引された。MT処理ニジマスはニジマスの排卵メス体腔液に誘引されなかった。性ステロイドが性フェロモンの感知に関与していることが示唆され、アンドロゲン処理された小型の未成熟魚は誘引物質の生物試験に使えることがわかった。さらに、MT処理されたサクラマス未成熟オスは、エストラジオール 17β (E₂, 10ppm) を6週間経口投与された未成熟スモルトの匂いを好むことがわかり、エストロゲンがフェロモンの分泌に関与することが示唆された。

オス誘引物質に種特異性が存在するか否かを明らかにした。サクラマスとニジマスにおいて、MTを3-4週間経口投与された両種未成熟魚は、同種の排卵メス尿に誘引されることがわかった。また、サクラマス早熟オスと上記2種の尿の他、アメマス排卵メス尿を用いた実験においても同様に種特異性を示す結果が得られた。したがって、少なくともサケ属の排卵メス尿中には明確な種特異性を示すリリースフェロモンが存在することが示された。

サクラマスにおいて、フェロモン活性を確認した排卵メス尿に様々な処理を施し、早熟オスとMT投与未成熟オスを用いた行動実験によってフェロモンの化学的性状を検討した。熱安定性を調べるため、37°Cで30分と60分、100°Cで3分、常温で24時間の処理を行ったところ、いずれも誘引活性は失われた。次に、限外濾過膜とゲル濾過による分画から、オス誘引物質の分子量は約5000-6500であると推定された。分子量10000以下の画分のエーテル抽出によって、中性画分 (ステロイドを含む)、酸性画分 (PGFsを含む)、塩基性画分、エーテル不溶水層画分を作成し実験に用いた結果、塩基性下抽出画分にオス誘引活性が認められた。また、限外濾過によって分画された分子量5000-10000の塩基性下エーテル抽出画分も同様にオス誘引効果のあることが示された。塩基性下エーテル抽出画分をシリカゲルカートリッジによって分画したところ、極性の高いメタノール溶出画分にオス誘引活性は認められず、極性の低いエーテル溶性画分に誘引活性が認められた。以上の結果から、サクラマスにおけるオス誘引フェロモンは、高分子タンパクや性ステロイドとプロスタグランジンを含むホルモナルフェロモン様物質ではなく、熱安定性が低く比較的極性の低い分子量約5000-6500のエーテル溶性の塩基性物質であることが考えられた。

RIA法によりPGF₂ α を定量した結果、未熟雌尿、成熟雄尿、未排卵雌尿、体腔液よりも排卵メス尿 (実験水路内の濃度は $1.9 \times 10^{-14}M$) に多く含まれることがわかった。また、早熟オスとMT投与未成熟オスは、実験水路内で $1.9 \times 10^{-9}M$ の

PGF_{2α}に対する有意な選好性を示さなかったが、遊泳行動が活性化された。従って過去の報告と同様、サクラマスにおけるPGFsは繁殖時の行動活性の向上に関係することが示唆された。したがって、オスに作用する排卵メス尿中にはリリーサーフェロモンとしてオスを誘引する物質と、オス誘引機能を持たないがオスの行動を活性化する物質という機能の異なる2成分が存在することが示唆された。

サクラマスの性フェロモン放出に関わる腎臓機能の変化を調べた。腎臓の体重比(KSI [kidney somatic index])と尿量比(生殖腺と内蔵除去体重で換算)を求めた。また、成魚とMTとE₂を投与した河川型オスの腎臓を採取後、細尿管の組織観察を行った。成魚のKSIは、雌雄とも成熟に伴って高くなり、尿量はKSIと同調し成熟に伴って増加した。腎臓の細尿管を構成する上皮細胞も、成熟雌雄は未熟雌雄に比べ有意に厚くなった。排卵メスの細尿管上皮細胞の厚い個体と薄い個体が存在することが示された。この細胞の変化は、オス誘引フェロモンの放出あるいは分泌に何らかの関係があることが示唆された。MTとE₂を投与した河川型オスの腎臓細尿管の上皮細胞の厚さも対照魚と比べて有意に高い値を示したことから、性ステロイドによる腎臓の肥厚化が成熟期のケミカル・コミュニケーションに関わる腎機能の変化に関与することが示唆された。

本研究の結果から、サケ属魚類は成熟すると雌雄の尿量が増加し、その中に成熟オスの繁殖行動と関わるリリーサーフェロモンが存在することが明らかになった。また、成熟オスを誘引する排卵メスの尿中にあるリリーサーフェロモンは、種特異性を示し、高分子タンパクやホルモン様物質とは異なるエーテル溶性の誘引物質と、オスの行動を活性化させるPGFsという少なくとも2成分の存在が示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	荒井	克俊
副査	教授	原	彰彦
副査	助教授	後藤	晃
副査	助教授	上田	宏

学位論文題名

Releaser pheromones in the urine of *Oncorhynchus* species

サケ属魚類の尿中リリーサーフェロモン

魚類の繁殖に関わる化学物質としての性フェロモンには、内分泌に影響する「プライマーフェロモン」と行動を誘起する「リリーサーフェロモン」がある。これまでコイ目数種において、ホルモン様物質が性フェロモンの役割を果たすことが明らかにされてきた。一方、サケ科魚類の性フェロモンは排卵メスの体腔液に存在すると考えられてきたが、結論は得られていない。近年、排卵メス尿中の性ステロイドやF型-プロスタグランジン (PGFs) がプライマーフェロモンとして作用すると報告されたが、リリーサーフェロモンについては物質を同定した報告は乏しく、その由来、放出時期、生態的役割に関する知見は殆ど得られていない。本研究は主にサクラマスとニジマスを用いて、尿中フェロモンの存在、フェロモンの受容と分泌に対する性ステロイドの関与、フェロモンの種特異性、フェロモンの化学的性状、成熟雌雄の腎臓の変化について明らかにすることを目的とし、以下の成果が評価された。

1) 申請者によって新たに開発された採尿専用カテーテルの先端部の構造は「挿入しやすく抜けにくい」形状になっており、チューブの外径、供試魚の尿道径とマッチさせた結果、その安定性は極めて優れ、数日間の連続採尿を可能にした。

2) 排精している早熟オスは排卵メス尿に誘引されるが、排卵メスの体腔液はオスを誘引しないことを明らかにした。また、未熟オスは成熟オス尿を忌避するという全く新しい知見を得た。

3) サクラマスとニジマスにおいて、メチルテストステロン (MT) を経口投与した未成熟魚は、排卵メス尿に誘引され、サクラマスと同様ニジマスにおいても排卵メス体腔液に誘引されないことを示した。性ステロイドが性フェロモンの受

容を制御することを示唆し、MT投与された未成熟魚は誘引物質の生物試験に使えることを示した。さらに、MT投与されたサクラマス河川型未成熟オスは、エストラジオール 17β を経口投与した未成熟スモルトの匂いを好むことから、エストロゲンがオス誘引物質の分泌に関与することを示唆した。これらの結果から、非繁殖期であってもステロイドを投与すればフェロモンの実験が可能であることを示した。

4) オス誘引物質に種特異性が存在するか否かを明らかにした。サクラマスとニジマスの非繁殖期において、MTを経口投与した両種未成熟魚は、同種の排卵メス尿に誘引されることを示した。また、サクラマス繁殖期に早熟オスと上記2種の尿の他、アメマス排卵メス尿を用いた実験においても同様に種特異性を示すことから、少なくとも実験に用いたサケ属の排卵メス尿中には明確な種特異性を持つリリーサーフェロモンが存在することを実証した。

5) 早熟オスとMT投与した未成熟オスを用いた行動実験によってサクラマス排卵メス尿中のリリーサーフェロモンの化学的性状を検討した。その結果、オス誘引フェロモンは高分子タンパクや性ステロイドとプロスタグランジンを含むホルモン様物質とは異なり、熱安定性が低く比較的極性の低い分子量約5000-6500のエーテル溶性の塩基性物質であると推定した。RIA法による定量の結果、PGF 2α は、未熟雌尿、成熟雄尿、未排卵雌尿、体腔液よりも排卵メス尿に多く含むことが明らかになった。一方早熟オスとMT投与未成熟オスは、実験水路内のPGF 2α に対し選好性を示さなかったが遊泳活性の向上を示した。従って排卵メス尿中フェロモンには、本研究で見出された分子量数千の誘引物質とオスの行動を活性化させるPGFsという2成分が含まれることを示唆した。

6) サクラマスのフェロモン放出に関わる腎臓の変化を調べた。成魚の腎臓の体重量比と尿量比（生殖腺と内蔵除去体重で換算）は同調し成熟雌雄で増加すること、腎臓の細尿管を構成する上皮細胞が成熟雌雄では未熟雌雄に比べ厚くなることを明らかにした。排卵メスの細尿管上皮細胞には厚い個体と薄い個体が存在することを示し、オス誘引フェロモンの放出あるいは分泌に何らかの関係があることが示唆した。MTとエストラジオール 17β を投与した河川型未成熟オスの腎臓細尿管の上皮細胞の厚さも対照魚と比べて有意に高い値を示すことから、性ステロイドによる腎臓の肥厚化が成熟期のケミカル・コミュニケーションに関わる腎機能の変化に関与することを示唆した。

申請者による以上の成果はサケ科魚類の繁殖行動に関わる性フェロモンの解明に大きく寄与するものであり、審査員一同は本研究が博士(水産科学)の学位を授与される資格のあるものと判定した。