

学 位 論 文 題 名

Studies on the mechanisms of heterochrony between
metamorphosis and gonadal development
in the salamander, *Hynobius retardatus*

(エゾサンショウウオにおける変態と生殖腺の発達の異時性に関する研究)

学位論文内容の要旨

一般的に両生類の生活史は水棲生活を行う幼生期間と変態後の成体期間に分けられるが、有尾両生類では変態を行わずに幼生形態のまま性的に成熟し繁殖を行うネオテニー(幼形成熟)現象が知られている。この現象はカエルなどの無尾両生類では起こらず、有尾両生類特有の生活様式として発生学的、内分泌学的、さらには進化生態学的な研究価値がある。これまで両生類の変態に関する研究は無尾類を中心に行われてきたが、有尾類の幼形成熟機構の研究は新たな実験モデルであり無尾類では得られない新しい知見が期待できる。

エゾサンショウウオは日本で唯一過去に幼形成熟の報告があるサンショウウオであるが、現在ではその個体群は絶滅したと考えられ、従ってこの種の幼形成熟成立機構はわかっていない。そこで私はこのサンショウウオの通常個体群を用い、人為的変態抑制を利用して外部形態の変態を抑制し、生殖腺の発達や下垂体に見られる内分泌学的影響などを細胞組織化学的、免疫組織化学的、分子生物学的解析法を用いて調べた。本種において外部形態の変態と生殖腺の発達のメカニズムや相関関係を調べることは、幼形成熟機構の解明につながり、両生類の個体発生や適応の多様性を知る上で重要かつ新しい発見が期待できるだろう。

第1章では外部形態の変態抑制が生殖腺の発達に与える影響を調べるために、エゾサンショウウオの変態抑制個体を作製した。変態抑制法として下垂体除去、甲状腺除去、甲状腺阻害剤を含む水での飼育が行われた。すると下垂体除去個体では生殖腺の発達は抑制される一方で、甲状腺除去、甲状腺阻害剤飼育個体では幼生形態のまま精巣が早熟的に発達した。このことは本種が幼生型を維持したまま性成熟する可能性を示唆した。

変態抑制個体の下垂体では前葉のほとんどの領域を甲状腺刺激ホルモン(TSH)細胞が占めることが免疫組織学によって示された。また、それらが過分泌型のTSH細胞であることが電子顕微鏡観察で確認された。さらに変態抑制個体の下垂体のホモジェネートには通常個体に比べ高い生殖腺刺激活性が認められたため、過剰分泌されたTSHが変態抑制個体の生殖腺を刺激していると考えられた。一方で、哺乳類TSHの注射実験ではエゾサンショウウオの精巣に発達促進が見られなかった。このことはエゾサンショウウオTSHが生殖腺刺激活性をもっていること、もしくは変態抑制によって生殖腺刺激ホルモンそのものが分泌されることなどの可能性を示唆している。

第2章では変態抑制個体の精巣の早熟の原因を、下垂体における遺伝子発現に着目して分子生物学的手法で調べた。変態と生殖腺の発達にそれぞれ関わるTSHと濾胞刺激ホルモ

ン (FSH) の β サブユニットの cDNA をクローニングし、甲状腺障害の変態抑制によって遺伝子発現にどのような変化が現れるのかを分子生物学的手法で調べた。通常変態個体と異なり、変態抑制個体では甲状腺ホルモンが産生されないためにネガティブフィードバックが働かず、下垂体前葉で大量の TSH β 遺伝子が発現することが確かめられた。意外にも同時に FSH β 遺伝子の発現も有意に上昇することがわかり、TSH と FSH の調節にいくらか重なりがあることが示唆された。したがって甲状腺の機能不全が変態を抑制する一方、生殖腺刺激ホルモン (GTH) の分泌増加が生殖腺を発達させることが、変態抑制個体の精巣の早熟発達に関わっていると考えられた。

更に甲状腺の障害による下垂体の他のホルモン遺伝子の発現変化を調べるため、プロオピオメラノコルチン (POMC)、プロラクチン (PRL)、成長ホルモン (GH) の cDNA をクローニングした。特に両生類の変態のタイミングに影響を与えるとされるホルモン

(TSH, POMC, PRL) については通常変態期間の遺伝子発現も調べられた。正常変態個体におけるこれら遺伝子の発現は以下のものであった。TSH β 遺伝子は変態絶頂期に高く発現し、変態に必要な甲状腺ホルモンの高まりを作り出すと考えられた。抗変態作用で知られる PRL の遺伝子発現も、他の両生類と同様に変態絶頂期に高く、これは絶頂期の組織特異的な変態の調節をしていると考えられた。副腎皮質刺激ホルモン

(ACTH) を含む前駆体蛋白質 POMC の遺伝子発現は絶頂期後半に高かった。これは ACTH により副腎皮質から分泌されるコルチコイドがトリヨードチロニン (T_3) 合成酵素の働きを活性化させることから、変態絶頂期の完了に関わっている事が考えられた。

これらの遺伝子とさらに GH の発現を変態抑制個体で調べたところ TSH β 以外は発現量が減少することが *in situ* hybridization と Northern blot で確かめられた。このことは本種の変態抑制個体では、下垂体細胞間の分化可塑性により他のホルモン細胞が TSH β を発現し始めるというこれまでの考えと一致した。実際に脊椎動物の様々な種で下垂体細胞は柔軟な分化可塑性を有し、多くの分化転換や異種ホルモンを共発現すること報告されている。

エゾサンショウウオでは棲息場所の標高が高くなると主に夏場の低水温が原因で変態が遅れ、越冬した次の年に変態する越冬幼生が観察される。第3章ではこういった自然環境下において変態が遅れている個体において、外部形態と生殖腺の異時的発生の可能性を検証した。幼生の越冬回数 (年齢) を骨齢査定によって決め、年齢と生殖腺の発達の相関関係を調べてた。その結果、3回越冬してなお変態絶頂期に入らない幼生 (4年目個体) が存在し、それらは同じ発生段階にある一年目個体に比べ生殖腺のサイズや生殖細胞の数において勝っていることが判明した。さらに越冬幼生における TSH と GTH の β サブユニットの発現量を一年目個体と比較したところ、FSH β の遺伝子発現が有意に高かった。しかしながら TSH β と LH β の遺伝子発現には顕著な差が認められなかった。このことは越冬幼生が一年目個体と同じ発生段階にありながら、より発達した生殖腺を持つことと関係が深いと思われる。従って、エゾサンショウウオでは外部形態が幼生型であっても視床下部一下垂体一生殖腺系の発達が進み、外部形態とは独立して生殖腺が年とともに発達していくことが予想される。このことから実験環境だけでなく自然環境においても外部形態と生殖腺の異時的発生が可能であることがわかった。この事実はこの種の幼形成熟繁殖の能力を裏付けるものである。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 山 下 正 兼

副 査 助 教 授 若 原 正 己

副 査 教 授 浦 野 明 央

学 位 論 文 題 名

Studies on the mechanisms of heterochrony between metamorphosis and gonadal development in the salamander, *Hynobius retardatus*

(エゾサンショウウオにおける変態と生殖腺の発達の異時性に関する研究)

一般的に両生類の生活史は水棲生活を行う幼生期間と変態後の成体期間に分けられるが、有尾両生類では変態せずに幼生形態のまま性的に成熟し繁殖を行うネオテニー（幼形成熟）現象が知られている。この現象は有尾両生類特有の生活様式として発生学的、内分泌学的、さらには進化生態学的な興味を集めている。北海道産のエゾサンショウウオは日本で唯一過去に幼形成熟の報告があるサンショウウオであるが、現在ではその個体群は絶滅したと考えられ、従ってこの種の幼形成熟成立機構はわかっていない。申請者はこのサンショウウオを用い、変態と生殖腺発達の時間的なずれ（異時性、ヘテロクロニー）を細胞生物学的、免疫組織化学的、分子生物学的解析法を用いて調べた。

第1章では外部形態の変態抑制が生殖腺の発達に与える影響を調べるために、エゾサンショウウオの変態抑制個体を作製した。変態抑制法として下垂体除去、甲状腺除去、甲状腺阻害剤処理がおこなわれた。下垂体除去個体では生殖腺の発達は抑制されるが、甲状腺除去、甲状腺阻害剤処理個体では幼生形態のまま生殖腺が早熟的に発達した。このことは本種が幼生型を維持したまま性成熟する可能性を示唆した。

変態抑制個体の下垂体では前葉のほとんどの領域を甲状腺刺激ホルモン (TSH) 細胞が占めることが免疫組織学によって示された。また、それらが過分泌型の TSH 細胞であることが電子顕微鏡観察で確認された。さらに変態抑制個体の下垂体のホモジェネートには通常個体にくらべ高い生殖腺刺激活性が認められたため、過剰分泌された TSH が変態抑制個体の生殖腺を刺激していると考えられた。しかし、哺乳類 TSH の注射実験ではエゾサンショウウオの精巣に発達促進が見られなかった。このことはエゾサンショウウオ TSH が生殖腺刺激活性をもっていること、もしくは変態抑制によって生殖腺刺激ホルモン (GTH) そのものが分泌されることなどの可能性を示唆している。

第 2 章では変態抑制個体の生殖腺の早熟の原因を、下垂体における遺伝子発現に着目して分子生物学的手法で調べた。変態と生殖腺の発達にそれぞれ関わる TSH と濾胞刺激ホルモン (FSH) の β サブユニットの cDNA をクローニングし、甲状腺障害の変態抑制によって遺伝子発現にどのような変化が現れるのかを調べた。変態抑制個体では甲状腺ホルモンが産生されないためにネガティブフィードバックが働かず、下垂体前葉で大量の TSH β 遺伝子が発現することが確かめられた。さらに、FSH β 遺伝子の発現も上昇することがわかり、TSH と FSH の合成・分泌調節にいくらか重なりがあることが示唆された。したがって甲状腺の機能不全が幼生の変態を抑制する一方、GTH の分泌増加が生殖腺を発達させると推定された。

また下垂体の他のホルモン遺伝子の発現変化を調べるため、プロオピオメラノコルチン (POMC)、プロラクチン (PRL)、成長ホルモン (GH) の cDNA をクローニングした。それらの遺伝子発現の様子を、正常個体と甲状腺機能障害個体で調べたところ、TSH β と FSH β 遺伝子は変態抑制によって発現が増強するが、それ以外のホルモン (GH, POMC, PRL) 遺伝子の発現は抑制されることが分かった。さらに、変態抑制個体では、PRL や GH を分泌する細胞が TSH を合成・分泌するようになるという下垂体細胞間の分化可塑性も確認され、下垂体細胞は環境に応じてきわめて柔軟に振る舞うことが、本研究ではじめて確かめられた。

エゾサンショウウオでは棲息場所の標高により、年内に変態できずに越冬するいわゆる「越冬幼生」が観察される。第 3 章ではこういった自然環境下において変態が遅れている個体を用いて、外部形態と生殖腺の異時的発生を解析した。幼生の越冬回数 (年齢) を骨齢査定によって決め、年齢と生殖腺の発達の相関関係を調べた。その結果、3 回越冬してなお変態絶頂期に入らない幼生 (4 年目個体) が存在すること、越冬幼生では同じ発生段階にある一年目個体に比べ生殖腺の発達が著しく進行することを見いだした。さらに越冬幼生における TSH と GTH の β サブユニットの発現量を一年目個体と比較したところ、FSH β の遺伝子発現が有意に高かった。しかしながら TSH β と LH β の遺伝子発現には顕著な差が認められなかった。このことは越冬幼生が一年目個体と同じ発生段階にありながら、より発達した生殖腺を持つことを内分泌学的に説明する。つまり、エゾサンショウウオでは外部形態が幼生型にとどまっても、生殖腺は時間とともに発達するという「異時性」が内分泌学的に証明された。この研究は環境依存的幼形成熟のしくみを、世界にさがかけて明らかにしたものである。

よって著者は、北海道大学博士 (理学) の学位を授与される資格があるものと認める。