

学 位 論 文 題 名

Biochemical and molecular biological study on effects of gonadotropin-releasing hormone and *Rhizopus* extract on somatic growth and sexual maturation in lacustrine salmonid fishes

（湖沼型サケ科魚類の成長と性成熟における
生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンとリゾプス抽出物の効果に関する
生化学的および分子生物学的研究）

学位論文内容の要旨

現在水産増養殖の現場では、目的の種苗をより大型に成長、成熟させるため精力的な取り組みがなされている。近年、より付加価値の高い種苗を搾出するためペプチド関連物質、アミノ酸を利用した新手法の導入、および外部環境要因を利用した成長・成熟制御技術の確立を推進する試みがなされており、今後は神経内分泌制御機構の解明が重要な課題になっている。成長や成熟を制御する基本的な神経内分泌因子を同定するためには、それら因子の産生動態や他の因子との相互作用をより詳細に理解する必要がある。しかし、内分泌機能の季節変動や各種の内分泌因子がどのような機序でサケの成長および性成熟に関与しているかは未だ不明な点が数多く、特に神経内分泌機構の解明を試みた研究はほとんどない。

本研究では、サケの成長および性成熟制御機構に関してさらに詳細な知見を得ることを目的として、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン（GnRH）、および *Rhizopus* 抽出物（RU）の 2 種の因子に注目し、それら因子が及ぼす生理的影響の成長と成熟に伴う変化をサクラマス（*Oncorhynchus masou*）およびヒメマス（*O. nerka*）を用い解析した。

GnRH の影響を調べるため GnRH のアナログ（GnRH_a）を投与し、種々の内分泌因子の変動を生化学的および分子生物学的に解析した。魚類の成長および成熟は、それらを制御する系に対して特定の因子が規則正しく分泌され、順序良く働くことによって進行する。一般に、成長ホルモン（GH）産生細胞からの GH の分泌、および生殖腺刺激ホルモン（GTHs）産生細胞からの GTH の分泌には GnRH が重要な役割を果たしていることが知られている。そこで成熟期のサクラマスに GnRH_a を筋中投与し、血漿中のステロイドホルモン（testosterone（T）、11-ketotestosterone（11-KT）、estradiol-17 β （E₂）、17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one（DHP）、および cortisol）量や脳下垂体中の GTH I β 、II β および α サブユニット mRNA 量を調べた。その結果、雄では血漿 11-KT 量が GnRH_a の投与量に依存して増加したのに対して、雌では血漿 T および 11-KT 量が投与後 14 日に増加した。雌雄ともに GnRH_a を 75 μ g 投与した群で 7 日目に GTH I β 遺伝子の発現が高まり、成熟期のサ

クラマスにおいて GnRH は 11-KT の産生や GTH I β 遺伝子の転写に関与している可能性が示唆された。一方、雄では血漿 DHP 量が GnRH α の投与量に依存して増加し、また GnRH α を投与したすべての群において GTH II β mRNA 量が増加する傾向が認められた。しかし、雌では GnRH α を 75 μ g 投与した群でのみ 14 日目に血漿 DHP 量が増加し、7 および 14 日目に GTH II β mRNA 量が増加した。これらの結果から、GnRH α は成熟期のサケ科魚類における脳下垂体－生殖腺系に関して、雌に比較し雄でより重要な役割を演じていることが推察された。

サケ科魚類において GH ファミリーに属する種々のホルモンは成長の促進や恒常性の維持に関与する重要な因子であることが示唆されているが、その発現メカニズムについては不明である。そこで GnRH が GH ファミリーにどのような役割を演じているか調べるため、GH ファミリー遺伝子発現の季節変動をサクラマスを用いて調べた。脳下垂体中の GH、プロラクチン (PRL)、およびソマトラクチン (SL) mRNA 量を real-time PCR 法を用いて解析した結果、PRL mRNA 量は春に増加し、さらに GnRH α 投与が PRL mRNA 量の増加を増強することが本実験ではじめて明らかにされた。これらの結果は PRL がサケの摂餌場所から産卵場所への移行に関与する可能性を示しているが、それらがどのような機序でサケの回遊に関与しているかは今後さらに詳しく調べる必要がある。GH mRNA 量は冬に増加する傾向が認められ、PRL mRNA 量同様 GnRH α 投与による増加の増強が観察された。SL mRNA 量は雌雄ともに顕著な変化は認められなかった。以上の結果、サクラマスにおいて GnRH は成熟が開始される以前の生活期における GH および PRL 遺伝子発現の増加に関与し、魚類の成長に重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

サクラマスの雄の中には、通常の 2 年目秋の成熟期にさきがけて満 1 才の秋に成熟する魚が多く存在する。こうした早熟雄の出現には GnRH が関与していることが指摘されている。そこで満一才の秋に GnRH α 投与による種々の内分泌因子産生動態の変化を調べた。その結果、血漿中の 11-KT および DHP 量が GnRH α の投与に伴い増加し、さらに GTH サブユニット mRNA 量、ならびに GH/PRL/SL mRNA 量の増加が認められた。これはサクラマス早熟雄の性成熟過程には GnRH が重要な役割を果たしている事を示唆している。

RU はウズラの受精率向上、ウシの妊娠率促進、さらにラットにおけるステロイド生合成の促進作用が知られており、魚類の増養殖上においても重要な因子となる可能性がある。RU が魚類の成長ならびに性成熟にどのような役割を果たすか調べるため、年級群の異なるさまざまなグループのヒメマスに 20 mg/kg の RU を含有する餌を与え、尾叉長、体重、生殖腺体指数、および性ステロイドホルモンの血中量の変化を解析した。その結果、雌雄ともに体成長の増加を促進させる効果が認められ、雄では成熟の促進が認められた。実験群の血漿 T、11-KT および DHP 量は、対照群に比較し有意に高値を示し、GnRH α を投与した場合と類似していた。これらのことから、RU は魚類の成長を促進し、雄の成熟を早める効果をもつ因子であることが明らかにされた。

以上の結果から、サケ科魚類の成長および性成熟過程において GnRH は神経内分泌の制御、ならびに生殖腺の成熟に、RU は成長の促進に重要な役割を果たしていることが明らかにされ、栽培漁業や養殖の現場においてもこれら因子の活用は効果的であることが結論された。

学位論文審査の要旨

主 査	教 授	山 内 皓 平
副 査	教 授	原 彰 彦
副 査	教 授	上 田 宏
副 査	教 授	浦 野 明 央
副 査	助教授	足 立 伸 次

学 位 論 文 題 名

Biochemical and molecular biological study on effects of gonadotropin-releasing hormone and *Rhizopus* extract on somatic growth and sexual maturation in lacustrine salmonid fishes

(湖沼型サケ科魚類の成長と性成熟における
生殖腺刺激ホルモン放出ホルモンとリゾプス抽出物の効果に関する
生化学的および分子生物学的研究)

現在水産増養殖の現場では、目的の種苗をより大型に成長、成熟させるため精力的な取り組みがなされている。近年、より付加価値の高い種苗を搾出するためペプチド関連物質、アミノ酸を利用した新手法の導入などがなされており、今後は神経内分泌制御機構の解明が重要な課題になっている。しかし、サケ科魚類において内分泌機能の季節変動や各種の内分泌因子がどのような機序でサケの成長・性成熟に関与しているかは未だ不明な点が多い。

本論文では、サケの成長および性成熟制御機構に関してさらに詳細な知見を得ることを目的として、生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH)、および *Rhizopus* 抽出物 (RU) の2種の因子に注目し、それら因子が及ぼす生理的影響の成長と成熟に伴う変化をサクラマス (*Oncorhynchus masou*) およびヒメマス (*O. nerka*) を用い解析した。

魚類では一般に、成長ホルモン (GH) 産生細胞からのGHの分泌および生殖腺刺激ホルモン (GTH) 産生細胞からのGTHの分泌にはGnRHが重要な役割を果たしていると考えられている。そこで成熟期のサクラマスにGnRHのアナログ (GnRHa) を筋中投与し、血漿中のステロイドホルモン

(testosterone (T)、11-ketotestosterone (11-KT)、estradiol-17 β (E₂)、17 α ,20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP)、およびcortisol)や脳下垂体中のGTH I β 、II β および α サブユニットのmRNA量を調べた。雌雄ともに血漿11-KT量がGnRHaの投与によって増加しGTH I β 遺伝子の発現もGnRHa投与によって高まったことから、GnRHは11-KTの産生やGTH I β 遺伝子の発現に関与している可能性が示された。一方、雄では血漿DHP量がGnRHaの投与量に依存して増加しGnRHaを投与したすべての群でGTH II β mRNA量が増加する傾向があったのに対し、雌ではそれらの変化はGnRHaを75 μ g投与した群でのみ見られた。これらの結果から、GnRHは成熟期のサケ科魚類における脳下垂体－生殖腺系で、雌に比較し雄でより重要な役割を演じている可能性が示された。

さらに本論文ではGHファミリー (GH、プロラクチン (PRL)、およびソマトラクチン (SL)) mRNA量の変動をreal-time PCR法を用いて調べた結果、PRL遺伝子の発現は春に高まり、GnRHaがPRL mRNA量の増加を増強することを初めて明らかにした。これらの結果はPRLがサケの摂餌場所から産卵場所への移行に関与する可能性を示しているが、それらがどのような機序でサケの回遊に関与しているかは今後さらに詳しく調べる必要がある。GH mRNA量は冬に増加する傾向があり、PRL mRNA量同様GnRHa投与による増加の増強が観察された。このことから、サクラマスにおいてGnRHは成熟が開始される以前の生活期におけるGHおよびPRL遺伝子発現の増加に関与し、成長に重要な役割を果たしていることが明らかにされた。

サクラマスの雄の中には、通常の2年目秋の成熟期にさきがけて満1才の秋に成熟する魚が多く存在する。こうした早熟雄の出現にはGnRHが関与していることが指摘されている。そこで満一才の秋にGnRHa投与による種々の内分泌因子産生動態の変化を調べた。その結果、血漿中の11-KTおよびDHP量がGnRHaの投与に伴い増加し、GTHサブユニットmRNA量ならびにGH/PRL/SL mRNA量の増加も認められた。これはサクラマス早熟雄の性成熟過程にはGnRHが重要な役割を果たしている事を示唆している。

RUは複数の動物種で受精率、妊娠率促進、ステロイド生合成の促進作用などが知られており、魚類の増養殖上においても重要な因子となる可能性がある。そこで著者は年級群の異なる様々なグループのヒメマスに20 mg/kgのRUを含有する餌を与えてその効果を解析した。その結果、雌雄ともに体成長を促進させる効果が見られ、雄では成熟も促進された。実験群の血漿T、11-KTおよびDHP量は、対照群に比較し有意に高値を示し、GnRHaを投与した場合と類似していた。これらのことから、RUは魚類の成長を促進し、雄の成熟を早める効果をもつことが明らかになった。

以上のように、本論文ではGnRHおよびRUのサケ科魚類におよぼす生理的影響を生化学的および分子生物学的手法を用いて解析した結果、サケ科魚類に

においてGnRHは神経内分泌の制御ならびに生殖腺の成熟に、RUは成長の促進に重要な役割を果たしていることを明らかにし、栽培漁業や養殖の現場においてもこれら因子の活用は効果的であることを示した。

以上の成果は魚類において成長と成熟の関連性を示し、栽培漁業や養殖の現場への応用の基礎的知見を提供するものであり、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。