

学 位 論 文 題 名

Neurobiological bases for the regulation of
neurosecretory activity in the
preoptic neurosecretory system of salmonids

(サケ科魚類の視索前核神経分泌系における
神経分泌活動制御の神経生物学的基盤)

学位論文内容の要旨

魚類の神経葉ホルモンであるバソトシンとイソトシンは末梢において体液浸透圧の調節、ストレス反応、日周リズムに、また中枢では繁殖行動の発現に関わっている。このような多様な生理反応を統御するために、神経分泌細胞は内的小および外的環境から様々な信号を受け取り、末梢および中枢に対して適切に指令を送らなければならない。しかし、魚類の神経内分泌系がどのように多様な入力に対する生理的な反応を統御しているのかよくわかっていない。サケ科魚類は母川回帰時に淡水移行と性成熟を経験するが、これらの生理過程の調節に神経葉ホルモンが関与していると予想される。そこで本研究はサケ科魚類をモデルとして、フィールド実験および神経生理学的・解剖学的手法を用いて視索前核神経内分泌系の構造と機能について解析を行った。

浸透圧刺激に対する神経分泌細胞の反応が性成熟の進行に伴ってどのように変化するか調べるため、母川回帰時のシロザケを海水から淡水に移行し、神経葉ホルモン遺伝子の視床下部での発現変化を定量的ドットプロットハイブリダイゼーション法によって測定した。また卵成熟誘起ホルモン $17\alpha, 20\beta$ -DHP の血中濃度を EIA 法により測定した。沿岸海洋環境の年ごとの変動に対応して回帰魚の成熟状態は異なっており、それに対応して淡水移行に対するホルモン mRNA 量の変動パターンが異なっていた。成熟が進行し、塩分耐性が低下している魚ではバソトシン mRNA 量が海水群で増加し、淡水群で低下した。しかし、成熟が進んでいない魚ではそのような変化は見られなかった。また、成熟に伴う血中 $17\alpha, 20\beta$ -DHP 濃度の増加はホルモン mRNA 量の低下と対応していた。このことから、母川回帰時シロザケの神経葉ホルモン遺伝子の発現調節には浸透圧刺激と成熟状態という 2 つの要因が関わっていることがわかった。(第 1 章)

神経葉ホルモンの血中濃度および視床下部での mRNA 量は日周変動を示すことが知られている。内分泌系の日周リズムが成熟の進行によってどのような影響を受けるか調べるため、母川回帰時のシロザケを海水および淡水域で採捕し、自然日長下での視床下部ホルモン mRNA 量、血中メラトニン濃度、血中コルチゾル濃度の日周変化を測定した。採捕時の塩分環境に関わらず、最終成熟時のシロザケではメラトニンの日周リズムが弱まり、神経葉ホルモン mRNA 量および血中コルチゾル濃度の日周変動は消失していた。このことから、ホルモン mRNA の発現が最終成熟時に抑制されていることが示唆された。(第 2 章)

以上の結果は、神経分泌細胞の反応が外界および体内からの多様な入力(環境塩分、光周期、性成熟)によって制御されていることを示している。神経葉ホルモンの放出・合成は神経分泌細胞の神経活動によって調節されることから、様々な入力に対する神経活動の変化を調べることで神経分泌細胞の情報処理メカニズムを明らかにできると考えられる。そこでニジマ

ス脳の *in vitro* 系を用い、コンフォーカル Ca^{2+} イメージング法により神経活動の長時間記録を行った。その結果、ニジマスの神経分泌細胞は 3-5 分の間隔で自発的な細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇を示すこと、このカルシウムパルスは細胞間で同期しており、しかも周期の異なる 2 つのグループに分かれることがわかった。次に記録した細胞の種類を二重免疫蛍光染色によって調べると、周期の異なる 2 つのグループはそれぞれバソトシン細胞とイソトシン細胞に対応していた。これらの結果から、バソトシン細胞とイソトシン細胞がそれぞれ別個に神経ネットワークを形成し、異なる振動パターンを生成していると考えられる。またイメージングと同時に *cell-attached* パッチクランプ法による電気活動の記録を行ったところ、細胞内 Ca^{2+} 濃度の上昇が活動電位のバースト発生と対応していた。浸透圧変化に対するカルシウムパルスの変動を調べたところ、高浸透圧刺激に対してはパルスの間隔が長くなり、逆に低浸透圧刺激に対してはパルスの間隔が短くなるという結果が得られた。このことから、神経分泌細胞は体液浸透圧の変化に対し、パルスの間隔を変えることで下垂体からのホルモン放出量を適切に調節していると考えられる。(第 3 章)

同期カルシウムパルスの生成に関与する神経ネットワークの構造を調べるため、コンフォーカル免疫蛍光法によりニジマス脳の神経分泌細胞集団の細胞構築を解析した。また神経葉ホルモンの中樞での投射パターンを調べるため、ゴルジ様免疫染色および細胞内染色を行った。神経分泌細胞は同種細胞同士でクラスターを形成していた。バソトシン細胞はお互いに突起の基部近くで接触しており、一方イソトシン細胞はギャップジャンクションによって連絡していた。バソトシンおよびイソトシンの免疫陽性繊維は脳内に広く分布していた。また個々の神経分泌細胞が下垂体神経葉と視床下部外の脳領域に同時に投射していた。以上より、神経分泌細胞は同種細胞間でネットワークを形成することで同期的な神経活動を行い、その出力は末梢と中樞へ同時に送られると考えられる。(第 4 章)

第 1 章、第 2 章の結果から、神経分泌細胞の活動が性成熟の状態によって変化することが示唆された。性成熟の進行はゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)産生細胞によって制御されている。そこで神経分泌細胞の神経活動が GnRH によって調節されている可能性を、ニジマス脳の *in vitro* 系を用い、コンフォーカル Ca^{2+} イメージング法により検討した。二重免疫染色により、ニジマスの脳に存在する 2 種類の GnRH であるサケ GnRH およびニトリ GnRH II の線維が神経分泌細胞の近傍に投射していることがわかった。これらの GnRH を投与するとカルシウムパルスの頻度が濃度依存的に上昇し、この作用はアンタゴニストによって抑えられた。このことから GnRH 細胞が神経分泌細胞の活動を調節していることが示唆された。(第 5 章)

以上より、サケ科魚類の視索前核神経分泌細胞は様々な生理的刺激に反応して同期的神経活動のパターンを変化させ、ホルモンの放出量を調節していること、また下垂体および視床下部外領域への投射経路を介して、末梢および中樞の反応を協調的に制御していることが明らかになった。哺乳類の神経分泌系は機能的に分化した複雑なシステムからなり、魚類の神経分泌系が単純なメカニズムを用いて多様な生理機能を調節していることと対照的である。脊椎動物の神経内分泌系が、同じ神経葉ホルモンを用いながら、種ごとの生理的な必要性に応じて多様化した進化の過程は非常に興味深い問題である。

学位論文審査の要旨

主査	教授	浦野	明央
副査	教授	小池	達郎
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

Neurobiological bases for the regulation of neurosecretory activity in the preoptic neurosecretory system of salmonids

(サケ科魚類の視索前核神経分泌系における
神経分泌活動制御の神経生物学的基盤)

魚類の神経葉ホルモンであるバソトシンとイソトシンは多様な生理反応の調節に関わっているが、それらを産生している神経分泌細胞が、内的小および外的環境から様々な信号を受け取って統合し、末梢および中枢に適切な指令を送る機構はよく分かっていない。サケ科魚類は母川回帰時に淡水移行と性成熟を経験するが、これらの生理現象の調節には、神経葉ホルモンが関与していることが予想される。そこで、本学位論文では、サケ科魚類をモデルとして、フィールド実験および神経生理学的・解剖学的手法により視索前核神経内分泌系の活動制御の神経生物学的基盤についての研究を行い、以下のことを明らかにした。

1. 浸透圧刺激に対する神経分泌細胞の反応が性成熟の進行に伴ってどのように変化するか調べ、沿岸海洋環境の年ごとの変動に対応して回帰魚の成熟状態が異なっていること、それに対応して淡水移行に対するホルモン mRNA 量の変動パターンが異なることを示した。成熟が進行し、塩分耐性が低下している魚ではバソトシン mRNA 量が海水群で増加し、淡水群で低下した。しかし、成熟が進んでいない魚ではそのような変化は見られなかった。このことから、母川回帰時シロザケの神経葉ホルモン遺伝子の発現調節には浸透圧刺激と成熟状態という2つの要因が関わっていることがわかった。

2. 神経葉ホルモンの血中濃度および視床下部での mRNA 量は日周変動を示すことが知られている。内分泌系の日周リズムが成熟の進行によりどのような影響を受けるか調べるため、母川回帰時のシロザケの自然日長下での視床下部ホルモン mRNA 量、血中メラトニン濃度、血中コルチゾル濃度の日周変化を測定した。採捕時の塩分環境に関わらず、最終成熟時のシロザケではメラトニンの日周リズムが弱まり、神経葉ホルモン mRNA 量および血中コルチゾル濃度の日周変動は消失していた。このことから、ホルモン mRNA の発現が最終成熟時に抑制されていることが示唆された。

3. *in vitro* のニジマス脳を用い、コンフォーカル Ca²⁺イメージング法によって神経分泌細胞の自発的な活動を記録したところ、神経分泌細胞は3-5分の間隔で同期して細胞内 Ca²⁺濃度の上昇、すなわちカルシウムパルスを示した。さらにバソトシン細胞とイソトシン細胞がそれぞれ別個に神経ネットワークを形成し、異なる振動パターンを生成していると考えられることが分かった。形態学的な解析は、神経分泌細胞が下垂体だけでなく、脳内各領域にも投射していることを示していたので、神経葉ホルモンのパルス状の放出が、中枢と末梢の生理機能の調節に重要であると考えられる。なお、神経分泌細胞の活動は、性成熟の状態によって変化していたので、性成熟の制御に関わるゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)を投与し

たところ、カルシウムパルスの頻度が濃度依存的に上昇し、この作用はアンタゴニストによって抑えられた。このことから GnRH 細胞が神経分泌細胞の活動を調節していることが示唆された。

以上より、サケ科魚類の視索前核神経分泌細胞は様々な生理的刺激に反応して同期的神経活動のパターンを変化させ、ホルモンの放出量を調節していること、また下垂体および視床下部外領域への投射経路を介して、末梢および中枢の反応を協調的に制御していることが明らかにした。哺乳類の神経分泌系は機能的に分化した複雑なシステムからなり、魚類の神経分泌系が単純なメカニズムを用いて多様な生理機能を調節していることと対照的である。脊椎動物の神経内分泌系が、同じ神経葉ホルモンを用いながら、種ごとの生理的な必要性に応じて多様化した進化の過程は、非常に興味深い問題である。

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。