

学位論文題名

Physiological studies on somatic growth
and sexual maturation in salmonids

（サケ科魚類の体成長と性成熟に関する生理学的研究）

学位論文内容の要旨

魚類の養殖において、魚体の体成長および性成熟を促進するために内分泌機構や環境要因などの側面から様々な研究がなされてきた。しかし、サケ科魚類の体成長と性成熟の両方に関わる内分泌機構に関しては不明な点が多い。本研究では、サケ科魚類の体成長と性成熟に関する以下の3つの生理学的研究を行った。まず、生理活性物質を含有し魚類を含む脊椎動物において体成長および性成熟を促進することが報告されているクモノスカビ抽出物（*Rhizopus extract*; RU）が、サクラマス（*Oncorhynchus masou*）の体成長と性成熟に与える影響を調べた。次に、シロザケ（*O. keta*）のベーリング海から千歳川の孵化場までの母川回帰に伴う体成長と性成熟に関与するホルモンの分泌動態を調べた。さらに、熊石支場における池産サクラマスの低発眼卵率の原因に関する内分泌学的解析を試みた。

1. RUのサクラマスの体成長と性成熟におよぼす影響

洞爺湖実験所産のサクラマスを用いて長期RU投与の影響を調べた。実験魚は、体重1 kgに対してRUを0 mg（コントロール群）、20 mg（RU20群）、200 mg（RU200群）餌に混ぜて投与する3群に分け、24ヶ月間サンプリングを行った。毎月15-20尾を供試魚として、採血後に尾叉長・体重・生殖腺重量・肝重量を測定して生殖腺指数（GSI; 生殖腺重量×100/体重）を算出した。血清中のインシュリン様成長因子I（IGF-I）、テストステロン（T）、11-ケトテストステロン（11-KT）、エストラジオール-17β（E₂）、および17α,20β-デヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン（DHP）を時間分解蛍光免疫測定法（TR-FIA法）により測定した。

RU200群では0+の9月から1+の3月、未成熟魚では1+の4月から6月および2+の2月から3月、成熟魚の雄では1+の9月から10月、雌では1+の春・夏・秋および2+の春に魚体の体長・体重がコントロール群に比べ有意に増加した。また、RU200群のIGF-Iは、雄では1+の6月・9月・10月・12月および2+の3月・4月に、雌では1+の7月・8月・10月・12月および2+の3月・4月でコントロール群に比べて有意に増大した。また、RU20群およびRU200群のGSIは、コントロール群と比べて増加する傾向がみられたが統計的な差は見られなかった。さらにRU200群では、T・11-KT・E₂は産卵前に、DHPは産卵期に高値を示した。成熟RU200群では、アンドロゲンとDHPが著しく増加していた。長期RU投与により、サクラマスのIGF-I濃度が上昇したことにより体成長が促進され、さらにT・11-KT・E₂・DHP濃度が上昇したことにより性成熟が促進したと考えられた。

次に、RUおよびクロマト分画（RU分画A, B, C, D, E, F）が視床下部（HYP）、下垂体および生殖腺のホルモン放出に及ぼす影響を確かめるため、サクラマスの成熟個体を用いてRU培養実験を行った。L-15培養液1 ml中のRU濃度は0・1・10・100・1000 μg/ml、RU分画濃度は0・100・1000・10000 μg/mlとし、培養時間は6・12・18・24時間とした。培養後、培養液中のサケ型ゴナドトロピン放出ホ

ルモン (sGnRH)、ゴナドトロピン (黄体形成ホルモン; LH、卵胞刺激ホルモン; FSH)、およびステロイドホルモンを抽出し、TR-FIA 法にて各ホルモン濃度を測定した。その結果、HYP および下垂体では RU の濃度が高くなるのに伴って各ホルモン濃度が増加し、また培養時間が長くなるに従い各ホルモン濃度が上昇する傾向が認められた。さらに、ほとんどの RU 分画は、コントロールと比べて各ホルモン濃度を有意に増加させた。生殖腺でも、RU 分画 A および B についてはステロイドホルモン濃度が大幅に増加した。RU の生理活性物質が、脳-下垂体-生殖腺 (BPG) 系のホルモン分泌に関与していることが明らかになった。

以上の結果、RU はサクラマスにおいて BPG 系のホルモンの分泌を刺激して性成熟を促進する共に、IGF-I の分泌を刺激して体成長を促進させることが明らかになり、RU はサクラマスの増養殖において魚体の体成長および性成熟の両方を促進することに有効であることが示唆された。今後は、RU の生理活性物質についてより詳細に解析する必要がある。

2. シロザケの母川回帰に伴う体成長と性成熟に関与するホルモンの分泌動態

シロザケのベーリング海から千歳川の孵化場までの母川回帰に伴う BPG 系ホルモンおよび IGF-I の分泌動態を 2003 年から 2005 年まで調べた。シロザケは、ベーリング海および石狩沖から千歳の孵化場まで 7 地点にて採取した。断頭の後、脳 (嗅球; OB、終脳; TE、HYP) を摘出し、血液も採取した。OB・TE・HYP・脳下垂体の各部位の sGnRH 量を、脳下垂体のゴナドトロピン量、血中のステロイドホルモン (T・11-KT・E₂・DHP) および IGF-I 量を、TR-FIA 法により測定した。

GSI は 3 年間大きな差を見せず、雄ではベーリング海から石狩川河口まで上昇した後に減少し、雌ではベーリング海から孵化場まで上昇した。sGnRH は、OB・TE では石狩沖合で上昇し、石狩川河口 (河口) および石狩川と千歳川の分岐点 (分岐点) において最大値を示す傾向が見られた。HYP では、ベーリング海で高い値を示し、石狩沖合および石狩沿岸で上昇し、河口および分岐点において最高値を示した。また、脳下垂体の LH は、sGnRH と同様の傾向を示し、sGnRH は LH の生合成・分泌に関わっていると考えられた。一方、脳下垂体の FSH は河口まで上昇しそれ以降は下降した。

血中のアンドロゲンとエストロゲンは、年毎の相関がほとんど見られなかったが、河口および分岐点までは上昇する傾向が見られた。血中の DHP は分岐点までは低い値を示し、産卵場において急激に上昇した。血中の IGF-I は、3 年間とも同様の傾向を示し、雌雄ともに性成熟の進行に伴い急激な減少が見られた。IGF-I が成熟前に高値を示し、その後減少したことより、IGF-I は配偶子形成に BPG 系ホルモンの分泌動態に重要な影響を及ぼすことが考えられた。特に、IGF-I と 11-KT および E₂ の動態が同調していたことより、IGF-I は精子形成および卵黄形成に重要な役割を果たすことが示唆された。

以上の結果、シロザケの母川回帰には、BPG 系ホルモンの分泌動態が主導的役割を果たしていることが確認された。さらに、IGF-I がステロイドホルモンの分泌を介して配偶子形成に重要な役割を演じることが初めて明らかになった。BPG 系ホルモンと成長ホルモン-IGF-I 系がどのようにシロザケの体成長および性成熟に関与しているかを、今後より詳細に解析しなければならない。

3. 熊石支場における池産サクラマスの低発眼卵率の原因に関する内分泌学的解析

熊石支場池産サクラマスの低発眼卵率の原因を解析するために、熊石支場と森支場の成熟サクラマスを用いて、ストレスに関与するコルチゾルを指標として、血中および卵中のコルチゾル量を TR-FIA 法により測定し、発眼率を比較した。その結果、熊石支場における血中コルチゾル量は 5 月および 6 月において森支場の 12 倍もの高値を示した。一方、発眼率の増加に伴い卵中および血中のコルチゾル量は減少し、負の相関が確認された。また、発眼率の増加に伴い、卵中の甲状腺ホルモン量は増加した。卵と同様に血中においてもコルチゾル量は一定して高値を示したため、高コルチゾル量は発眼率を減少させたことが考えられた。

以上の結果、熊石支場のサクラマスは、何らかのストレスのため血中および卵中のコルチゾル量が増加し、発眼率が低下することが明らかになった。今後、ストレスの原因を解明して、低発眼率を向上させる必要がある。

以上のサケ科魚類の体成長と性成熟に関する 3 つの生理学的研究により、今後のサケ科魚類の増養殖に応用可能な内分泌機構に関与する重要な基礎的知見を数多く提供することができた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 田 宏
副 査 教 授 足 立 伸 次
副 査 助 教 授 東 藤 孝
副 査 講 師 清 水 宗 敬

学 位 論 文 題 名

Physiological studies on somatic growth and sexual maturation in salmonids

(サケ科魚類の体成長と性成熟に関する生理学的研究)

サケ科魚類の体成長と性成熟の両方に関わる内分泌機構に関しては不明な点が多い。本研究では、脳(サケ型ゴナドトロピン放出ホルモン:sGnRH)・下垂体(ゴナドトロピン;黄体形成ホルモン:LH、卵胞刺激ホルモン;FSH)・生殖腺(ステロイドホルモン;テストステロン:T、11-ケトテストステロン:11-KT、エストラジオール- 17β : E_2 、 17α , 20β -デヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン:DHP)(BPG)系ホルモンおよびインシュリン様成長因子I(IGF-I)を指標として、サケ科魚類の体成長と性成熟に関する3つの生理学的研究:1)クモノスカビ抽出物(*Rhizopus extract*;RU)がサクラマス(*Oncorhynchus masou*)の体成長と性成熟に与える影響、2)シロザケ(*O. keta*)のベーリング海から千歳川の孵化場までの母川回帰に伴う体成長と性成熟に関与するホルモンの分泌動態、3)熊石支場における池産サクラマスの低発眼卵率の原因に関する内分泌学的解析、を行った。

1. RUのサクラマスの体成長と性成熟におよぼす影響

洞爺湖実験所産のサクラマスを用いて長期RU投与の影響を調べた。実験魚は、体重1kgに対してRUを0mg(コントロール群)、20mg(RU20群)、200mg(RU200群)餌に混ぜて投与する3群に分け、24ヶ月間サンプリングを行った。毎月15~20尾を供試魚として、生殖腺指数(GSI)を算出し、血中のIGF-I、およびT、11-KT、 E_2 、DHPを時間分解蛍光免疫測定法(TR-FIA法)により測定した。RU200群の魚体の体長・体重がコントロール群に比べ有意に増加し、またRU200群のIGF-Iは、コントロール群に比べて有意に増大した。さらにRU200群では、T・11-KT・ E_2 は産卵前に、DHPは産卵期に高値を示した。長期RU投与により、サクラマスのIGF-I濃度が上昇して体成長が促進され、さらにステロイドホルモン濃度が上昇して性成熟が促進したと考えられた。

RUおよびRUのクロマト分画が、BPG系のホルモン放出に及ぼす影響を、サクラマスの成熟個体の脳、下垂体、および生殖腺を用いてRU培養実験を行った。培養後、培養液中のsGnRH、LHとFSH、およびステロイドホルモンを抽出し、TR-FIA法にて各ホルモン濃度を測定した。脳および下垂体ではRUの濃度が高くなるのに伴って各ホルモン濃度が増加し、また培養時間が長くなるに従い各ホルモン濃度が上昇する傾向が認められた。さらに、ほとんどのRU分画は、コントロールと比べて各ホルモン濃度を有意に増加させた。

以上の結果、RUはサクラマスにおいてBPG系のホルモンの分泌を刺激して性成熟を促進する共に、IGF-Iの分泌を刺激して体成長を促進させることが明らかになった。

2. シロザケの母川回帰に伴う体成長と性成熟に関与するホルモンの分泌動態

シロザケのベーリング海から千歳川の孵化場まで7地点におけるBPG系ホルモンとIGF-Iの分泌動態を2003年から2005年まで調べた。断頭の後、脳（嗅球；OB、終脳；TE、視床下部；HYP）を摘出し、血液も採取した。OB・TE・HYP・脳下垂体のsGnRH量を、脳下垂体のゴナドトロピン量、血中のステロイドホルモンおよびIGF-I量を、TR-FIA法により測定した。sGnRHは、OB・TEでは石狩沖合で上昇し、石狩川河口（河口）および石狩川と千歳川の分岐点（分岐点）において最大値を示し、HYPではベーリング海で高い値を示し、河口および分岐点において最高値を示した。脳下垂体のLHは、sGnRHと同様の傾向を示した。一方、脳下垂体のFSHは河口まで上昇しそれ以降は下降した。血中のT・11-KT・E2は河口および分岐点までは上昇する傾向が見られ、DHPは分岐点までは低い値を示し産卵場において急激に上昇した。血中のIGF-Iは、雌雄ともに性成熟の進行に伴い急激な減少が見られた。シロザケの母川回帰には、BPG系ホルモンの分泌動態が主導的役割を果たしていること、およびIGF-Iがステロイドホルモンの分泌を介して配偶子形成に重要な役割を演じるころが初めて明らかになった。

3. 熊石支場における池産サクラマスの低発眼卵率の原因に関する内分泌学的解析

熊石支場池産サクラマスの低発眼卵率の原因を解析するために、熊石支場と森支場の成熟サクラマスを用いて、ストレスに関与するコルチゾルを指標として、血中および卵中のコルチゾル量をTR-FIA法により測定し、発眼率を比較した。その結果、熊石支場における血中コルチゾル量は森支場の12倍もの高値を示した。一方、発眼率の増加に伴い卵中および血中のコルチゾル量は減少し、負の相関が確認された。熊石支場のサクラマスは、何らかのストレスのため血中および卵中のコルチゾル量が増加し、発眼率が低下することが明らかになった。

以上のように、本論文はサケ科魚類の体成長と性成熟の内分泌機構に関与する重要な知見を数多く提供しており、その成果は水産科学の基礎的および応用的研究として評価された。よって審査員一同は申請者が博士（水産科学）の学位を授与される資格があるものと判定した。