

平成 22 年 11 月 22 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19380118

研究課題名（和文） ヒメマスの降河行動を制御する天然生物活性物質

研究課題名（英文） Bioactive compounds that regulate downstream migration of the sockeye salmon *Oncorhynchus nerka*

研究代表者

柳沢 忠（YANAGISAWA TADASHI）

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：90134262

研究成果の概要（和文）：ヒメマスの降河行動を制御する天然生物活性物質について検討した。鍵分子として甲状腺軸遺伝子群を選択し、cDNA クローニングを行うとともに発現部位を RT-PCR により同定した。また、*in situ* ハイブリダイゼーションにより脳内発現部位のマッピングと降河行動期における発現量の変動を調べた。甲状腺軸ホルモンの測定も行った。これらの結果から、天然生物活性物質によるヒメマス降河行動の制御機構の一端が明らかになった。

研究成果の概要（英文）：Regulatory mechanisms by bioactive compounds of down-stream migration in the sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) were investigated. Molecules involved in the regulation of the hypothalamo-pituitary-thyroid axis were selected as targets. cDNAs encoding thyrotropin-releasing hormone (TRHa and TRHb), 4 subtypes of TRH receptor (TRHR1, TRHR2a, TRHR2b, and TRHR3), and deiodinase type II were cloned and the sites of expression were demonstrated by RT-PCR. These results indicate that the hypothalamo-pituitary-thyroid axis plays important roles in the regulation of down-stream migration of the sockeye salmon.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	8,900,000	2,670,000	11,570,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産化学

キーワード：サケ科魚類，回遊，降河行動，天然生物活性物質，ホルモン，脳，下垂体，甲状腺

科学研究費補助金研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

シロザケ、カラフトマス、ベニザケなど海洋生活に高度に適応の進んだサケ科魚類 (*Oncorhynchus* 属) は北太平洋を広く回遊することが知られている (「サケ・マスの生態と進化」前川光司編, 文一総合出版, 2004)。このようなサケ科魚類の回遊の制御に神経伝達物質や脳ホルモンなど脳内の天然生物活性物質が関与していることには疑いがない。中でもサケ科魚類の母川回帰時の下垂体ホルモン, 視床下部ホルモン, 性ステロイドホルモンの動態に関しては, 多くの研究がある (Hiraoka *et al.*, Changes in expression of neurohypophysial hormone genes during spawning migration in chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *J Mol Endocrinol* 18:49-55, 1997; Onuma *et al.*, Year-to-year differences in plasma levels of steroid hormones in pre-spawning chum salmon. *Gen Comp Endocrinol* 133: 199-215, 2003 など)。しかしながら, 降河行動期におけるホルモン動態についての知見は比較的少ない。甲状腺ホルモンについては川下りの時期に一過性の上昇がみられることが知られている (Grau *et al.*, Lunar phasing of the thyroxine surge preparatory to seaward migration of salmonid fish. *Science* 211: 607-609, 1981)。しかし, その制御ホルモンと考えられる甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) や甲状腺刺激ホルモン (TSH) についてはその遺伝子の塩基配列が一部の魚種で解明されているが, mRNA の定量および変動についてはほとんど研究がなく, TRH-TSH-甲状腺系 (甲状腺軸) 全体について総合的に解析している研究も見あたらなかった。また, 降河行動に関与する新規脳内生物活性物質の同定や EST 解析および DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析はまだ行われていなかった。

本研究では, 脳内の甲状腺軸に関わる天然生物活性物質を鍵物質として, サケ科魚類の回遊行動を制御する脳内分子機構を明らかにし, 生物の本能行動の遺伝子制御や化学制御の可能性を検討した。

2. 研究の目的

太平洋に生息するサケ科魚類は日本における最も重要な水産資源のひとつである。サケ科魚類, 中でも *Oncorhynchus* 属は成長の過程で河川から降海し, 北太平洋海域で索餌・成長した後, 再び産卵のために母川へ回帰するという独特の生活サイクルを持つ。これらの2つの回遊のうち, 生殖に関わる海から河川への移動 (母川回帰行動) については各分野で研究が多くなされているが, 河川から海への移動 (降河行動) については研究例が少なく不明な点が多い。

降河行動に先立ち, 幼魚はスモルト化 (銀化) と呼ばれる一種の変態や海水適応能の獲得などの生理的变化, ならびになわばりの消失や明暗に対する嗜好性が変化するなど行動面における変化を示すことが知られており, 甲状腺ホルモンや成長ホルモンが関与していることが明らかにされている。しかしながら, 外界の環境因子の変化をサケ科魚類がどのようにして受容し, 脳内でどのように情報が伝達をされて降河行動が制御されているのかは明らかではない。すなわち, サケ科魚類の降河行動を制御する脳内分子機構を明らかにすることは急務の課題である。そこで, 本研究においては, サケ科魚類の降河行動を制御する脳内分子機構について脳内の生理活性物質 (ホルモンや神経伝達物質), 中でも甲状腺ホルモン系の制御に関与する分子を鍵分子としてさまざまな側面から検討した。

3. 研究の方法

(1) 試料の採取

(2) 降河行動への関与が予測される甲状腺軸遺伝子群のcDNAクローニングと発現部位の同定

(3) PCR サブトラクションによる降河行動を制御する新規生物活性物質の単離と同定

(4) *In situ* ハイブリダイゼーションによる生理活性物質の脳内発現部位のマッピングと降河行動期における発現量の変動

(5) 降河行動に関与する脳内生理活性物質の測定系開発および定量

4. 研究成果

(1) 飼育実験と試料の採取: 降河行動を示す平成19年5月から8月にかけて, ヒメマスより脳, 下垂体, 血液などの組織を採取した。

(2) 降河行動への関与が予測される甲状腺軸遺伝子群の cDNA クローニングと発現部位の同定: ベニザケ (ヒメマス), シロザケ, サクラマス, ニジマス, およびイワナから2種類の TRH 遺伝子 (TRHa および新規遺伝子 TRHb) の cDNA 翻訳領域全長の塩基配列を決定した。ベニザケおよびサクラマス TRHb の DDBJ アクセション番号はそれぞれ AB481205, AB481207 である。ベニザケ, シロザケ, およびサクラマスの甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン (TRH) 受容体サブタイプ (TRHR1, TRHR2, および TRHR3) cDNA 全長の塩基配列を決定した。ベニザケ TRHR2 cDNA については2つの遺伝子 (TRHR2a および TRHR2b) が存在することが明らかになった。ベニザケおよびサクラマス TRHR の DDBJ アクセション番号はそれ

ぞれ AB481201-AB481204 および AB481208-AB481211 である。また、これらの遺伝子の発現部位を RT-PCR により明らかにした。さらに、甲状腺ホルモンの活性化(サイロキシン [T4] からトリヨードサイロニン [T3] への転換)に関与する iodotyronine deiodinase type II (Dio2) の cDNA 翻訳領域全長の塩基配列をベニザケ、シロザケ、およびサクラマスを対象に決定した。(3) PCR サブトラクションによる降河行動を制御する新規生物活性物質の単離と同定: 降河行動を制御する新規生物活性物質の単離と同定を行うため、降河個体と降河しなかった個体の脳を採取し、PCR サブトラクションにより発現量の変化する遺伝子の単離と同定を試みた。96 クローンのシーケンスを行ったが、興味深い遺伝子は見いだされなかった。

(4) *In situ* ハイブリダイゼーションによる生理活性物質の脳内発現部位のマッピングと降河行動期における発現量の変動: TRHa 遺伝子について降河行動期に採取したヒメマス脳を対象に *in situ* ハイブリダイゼーションにより発現部位と発現量の変動を調べた。その結果、TRHa は既報通り、嗅球、視索前野などに発現していることが確認されたが、降河行動期に発現量の変動はみられなかった。

(5) 降河行動に関与する脳内生理活性物質の測定系開発および定量: ヒメマス TSH β の演繹アミノ酸配列から合成ペプチドをデザインして TSH β 抗血清を作成し、ラジオイムノアッセイおよび時間分解蛍光イムノアッセイによる TSH 測定系を確立した。また、降河行動期における甲状腺ホルモンの血中動態をラジオイムノアッセイにより測定した結果を降河群と未降河群との間で比較したところ、降河群の T4 濃度が未降河群よりも有意に高いことが明らかになった。さらに、ヒメマス培養下垂体における TSH β mRNA 量をリアルタイム PCR により定量し、T3 が TSH β mRNA 量を減少させることを見いだした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Mekuchi M, Saito Y, Aoki Y, Masuda T, Iigo M, Yanagisawa T, Molecular cloning, gene structure, molecular evolution and expression analyses of thyrotropin-releasing hormone receptors from medaka (*Oryzias latipes*). *General and Comparative Endocrinology*, 査読有, in press.

- ② Iigo M, Abe T, Kambayashi S, Oikawa K, Masuda T, Mizusawa K, Kitamura S, Azuma T, Takagi Y, Aida K, Yanagisawa T, Lack of circadian regulation of *in vitro* melatonin release from the pineal organ of salmonid teleosts. *General and Comparative Endocrinology*, 査読有, 154, 2007, 91-97.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 角田麻衣, 齊藤悠一, 東照雄, 柳沢忠, 飯郷雅之, ベニザケ GPR54 の cDNA クローニング, 平成 21 年度日本水産学会大会, 2009 年 3 月 27-31 日, 東京.
- ② 齋藤悠一, 青木康洋, 東照雄, 飯郷雅之, 柳沢忠, サケ科魚類における甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体の cDNA クローニングと発現解析, BMB2008 (第 31 回日本分子生物学会年会・第 81 回日本生化学会大会 合同大会), 2008 年 12 月 9-12 日, 神戸.
- ③ Saito Y, Kambayashi S, Amiya N, Yasuo S, Yoshimura T, Amano M, Yanagisawa T, Iigo M, Pharmacological and molecular characterization of melatonin receptors in ayu (*Plecoglossus altivelis*), an osmerid teleost. Japan Taiwan Bilateral Science & Technology Symposium, November 10-12, 2008, Utsunomiya.
- ④ Kimijima M, Uesaka M, Takahashi D, Yanagisawa T, Iigo M Molecular cloning of parapinopsin cDNA from the pineal organ of the masu salmon (*Oncorhynchus masou*). Japan Taiwan Bilateral Science & Technology Symposium, November 10-12, 2008, Utsunomiya.
- ⑤ Tsunoda M, Kasahara K, Saito Y, Abe T, Yanagisawa T, Iigo M Molecular cloning and expression analysis of GPR54 in medaka (*Oryzias latipes*) and two salmonids, sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) and masu salmon (*O. masou*). Japan Taiwan Bilateral Science & Technology Symposium, November 10-12, 2008, Utsunomiya.
- ⑥ Takahashi D, Uesaka M, Fujita S, Azuma T, Yanagisawa T, Iigo M, Deep-brain photoreceptive molecules in fish. 5th World Fisheries Congress, October 20-24, 2008, Yokohama.
- ⑦ Saito Y, Aoki Y, Azuma T, Iigo M, Yanagisawa T, Molecular cloning of the second prepro-thyrotropin-releasing hormone cDNA in the sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*), 5th World Fisheries Congress, October 20-24, 2008,

Yokohama.

- ⑧ 青木康洋, 飯郷雅之, 柳沢忠, 魚類におけるプレプロ甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンの分子進化, 平成 20 年度日本水産学会春季大会, 2008 年 3 月 27-31 日, 静岡.
- ⑨ 斎藤悠一, 小林宣章, 木村真, 馬久地みゆき, 青木康洋, 東照雄, 飯郷雅之, 柳沢忠, 甲状腺刺激ホルモン放出ホルモン受容体の分子進化, 第 32 回日本比較内分泌学会大会, 2007 年 10 月 12-13 日.
- ⑩ 阿部朋孝, 増田智浩, 水澤寛太, 北村章二, 東照雄, 都木靖彰, 柳沢忠, 飯郷雅之, サケ科魚類松果体からのメラトニン分泌の生物時計による制御は進化のどの段階で消失したのか? 第 32 回日本比較内分泌学会大会, 2007 年 10 月 12-13 日.
- ⑪ 青木康洋, 斎藤悠一, 朴民根, 西源二郎, 吉村崇, 飯郷雅之, 柳沢忠, プレプロ甲状腺刺激ホルモン放出ホルモンの分子進化. 第 32 回日本比較内分泌学会大会, 2007 年 10 月 12-13 日.
- ⑫ 東照雄, 飯郷雅之, 柳沢忠, 天野勝文, 山森邦夫, 朝比奈潔, 日長・運動・高温処理がサクラマス雄早熟化に与える影響. 第 6 回日本水産増殖学会大会, 2007 年 7 月 18 日, 東京.
- ⑬ Iigo M, Abe T, Oikawa K, Fujita S, Endo M, Yanagisawa T, Nishi G, Circadian regulation of rhythmic melatonin release from the teleostean pineal organ: a comparative study. 72nd Cold Spring Harbor Symposium: Clocks & Rhythms, May 28-June 2, 2007, Cold Spring Harbor, NY, USA.

[図書] (計 7 件)

- ① 飯郷雅之 (2007) インドールアミン類(概説), 「ホルモンハンドブック新訂 eBook 版」(日本比較内分泌学会編), (南江堂).
- ② 飯郷雅之 (2007) セロトニン, 「ホルモンハンドブック新訂 eBook 版」(日本比較内分泌学会編), (南江堂).
- ③ 飯郷雅之 (2007) メラトニン, 「ホルモンハンドブック新訂 eBook 版」(日本比較内分泌学会編), (南江堂).
- ④ 飯郷雅之 (2008) 第 3 部 生物リズムの研究法 37. 光パルス, 「時間生物学事典」(石田直理雄, 本間研一編), pp. 104-105 (朝倉書店). 2008. 5
- ⑤ 飯郷雅之 (2008) 第 3 部 生物リズムの研究法 38. 温度パルス, 「時間生物学事典」(石田直理雄, 本間研一編), pp. 106-107 (朝倉書店).
- ⑥ 飯郷雅之 (2008) 第 4 部 生物時計 54. 松果体, 「時間生物学事典」(石田直理雄, 本間研一編), pp. 148-151 (朝倉書店).
- ⑦ 飯郷雅之 (2009) 魚類の光周性, 「光周性

の分子生物学」(海老原史樹文, 井澤毅編), (シュプリンガーフェアラーク東京).

[その他]

ホームページ等

<http://agri.mine.utsunomiya-u.ac.jp/hpj/deptj/chemj/jorganic/jorganic.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柳沢 忠 (YANAGISAWA TADASHI)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号: 90134262

(2) 研究分担者

東 照雄 (AZUMA TERUO)

独立行政法人水産総合研究センター・中央水産研究所・室長

研究者番号: 90360768

飯郷 雅之 (IIGO MASAYUKI)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号: 10232109

二瓶 賢一 (NIHEI KEN-ICHI)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号: 10307209

(3) 連携研究者

()

研究者番号: