

〈総説論文〉

魚類の生殖周期の内分泌制御機構

松山倫也

Endocrine regulation of reproductive cycles in fish

Michiya MATSUYAMA

This paper aims at reviewing recent information regarding the endocrine regulation of sexual maturation and reproductive cycles in teleost fish. Reproduction in fish, as well as in other vertebrates, is controlled by the endocrine system of brain-pituitary-gonad (BPG) axis. Melatonin contributes to synchronizing behaviors and neuroendocrine regulations with the annual and daily variations in photoperiod. Though many data on melatonin effects on crucial neuroendocrine regulator in fish reproduction have been shown, little is known regarding the mechanism of melatonin action on the BPG-axis. It is clear that the major regulators during sexual maturation are the GnRH, pituitary gonadotropins (LH and FSH) and sex steroids. Recent studies, however, show more complex endocrine regulation; numerous circulating endocrine and locally-acting neuroendocrine factors regulate the various stages of sexual maturation and spawning cycle. Moreover, some actors have entered the field of reproductive physiology. For example, KiSS system, found in mammals, seems to be central to the regulation of GnRH, and consequently LH and FSH secretion in fish. The basic mechanism underlying sexual maturation in fish would be progressed by using model species such as medaka and zebrafish; however, in fact, the controlling system of BPG-axis depends on species specificity. From the viewpoint of fishery management, it is needed to clarify the reproductive characteristics including maternal effects on the survival and recruitment of offspring in each species. In the final chapter, I am emphasizing the necessity to develop the captive experimental system of small pelagic fish to understand the change of reproductive characteristics controlled through the BPG-axis.

Key words: reproductive cycle, endocrine regulation, kisspeptin, GnRH, GTH, steroid hormones

1. はじめに

温帯域などの季節がある地域に生息する多くの魚類は、1年の中の特定の時期に産卵期をもつ。この産卵期を中心とした年間を通した生殖の周期を生産年周期 (annual reproductive cycle) という。また、多くの魚種は産卵期間中に一定の間隔で複数回の産卵を行うが、これを産卵周期 (short reproductive cycle, spawning cycle) という。「生殖周期」は、広義には生産年周期と産卵周期を合わせたものとして扱われ、狭義には産卵周期を意味するものとして用いられている。一般に魚類の生産年周期は主に日長および(あるいは)水温により大きな影響を受け、日長や水温変化に合わせて配偶子を発達させ、仔稚魚の生残に適切な時期に産卵を行っている。また、産卵周期も水温や光周期に

影響を受ける。

魚類の配偶子形成は基本的には他の脊椎動物と同様に、脳 (brain)-脳下垂体 (pituitary)-生殖腺 (gonad) を主軸 (Brain-Pituitary-Gonad axis, BPG-axis) とした内分泌系により制御されている。すなわち、脳内 (間脳の視床下部, hypothalamus) で産生された生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH) は脳下垂体に運ばれ、そこから生殖腺刺激ホルモン (GTH) を分泌させる。GTHにはFSH (濾胞刺激ホルモン) とLH (黄体形成ホルモン) の2種があり、血中に放出されたGTHは生殖腺での各種性ステロイドホルモンの合成を調節し、ステロイドホルモンにより生殖腺の発達が進行する。日長や水温などの外部環境要因の情報は感覚器官で受容された後、内在性リズムに基づく生理情報とともに脳で統合され、BPG-axisのもとで配偶子形成が進行すると考えられている。魚類のBPG-axisにおける内分泌制御機構に関する日本語の総説はこれまでも出されており (会田, 1989; 松山ほか, 2000; 小林・足立, 2002), 基本情報についてはそれらを参照されたい。しかし、近年

2009年8月4日受付, 2009年9月25日受理

九州大学大学院農学研究院

Department of Bioresource Sciences, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Fukuoka, Fukuoka 812-8581, Japan
rinya_m@agr.kyushu-u.ac.jp

この分野における研究の進展は著しく、これまでの成書では取り上げられなかった新しい事実が明らかにされつつある。

魚類の生殖における基本的機構は、メダカ *Oryzias latipes* や zebra danio *Danio rerio* (以降、ゼブラフィッシュ) などのモデル種を使った研究で進展することが予想されるが (Zohar et al., 2010), BPG-axisの制御機構は種により異なることも事実であり、水産学の立場からは、対象種における特異性を明らかにすることが重要であることはいまでもない。水産資源研究との関連で述べると、本特集号でキーワードの一つとなっている「繁殖特性」とは、産卵期(間)、産卵量、産卵回数、卵径、卵質、あるいは生残率などを指しており、繁殖特性は水温や餌条件などの外的要因に加え、親魚の体長、年齢、産卵履歴などの内的要因により影響を受ける (栗田, 2010; 米田, 2010)。繁殖特性の変化はBPG-axisを介してもたらされており、繁殖特性の変化を理解する上において、生化学的、分子生物学的指標となる生殖内分泌機構の研究は、これからの資源研究には不可欠であると考えられる。そのためには、詳細な解析を可能とする主要種を対象とした飼育実験系の確立が必要であり、現在われわれは、このような観点からマサバ *Scomber japonicus*、カタクチイワシ *Engraulis japonicus*、マアジ *Tra-*

churus japonicus で、親魚養成、産卵誘導、仔稚魚の育成を含む生活環を通じた飼育実験系の開発に取り組んでいる。本稿では近年の研究成果を取り入れ、われわれが現在研究しているマサバなどの情報を交えながら、どのような仕組みで魚類の配偶子が形成され、生殖年周期や産卵周期が維持されているのかを解説する。

2. 脳の内分泌因子

配偶子形成はBPG-axisの制御のもとで進行するが、外部環境情報の脳内における情報伝達、制御の機構は、現在においても魚類ではほとんど未解明のままである。哺乳類で明らかにされている外部環境情報、特に光周期による生殖周期の調節機構を紹介した後、魚類における現在の知見を紹介する。

2.1. メラトニン

温帯に生息する哺乳動物では、秋から冬にかけて交尾行動を起こす種を短日繁殖動物、春に交尾行動を起こす動物を長日繁殖動物といい、季節を知るための最適な環境因子は日長である場合が多い。哺乳類の光受容器は網膜のみであり、網膜で受容された周期的な明暗の情報は網膜-視床下部を結ぶ神経回路により視交叉上核 (suprachiasmatic nucleus; SCN) へと入力する (Fig. 1)。視交叉上核は哺乳類

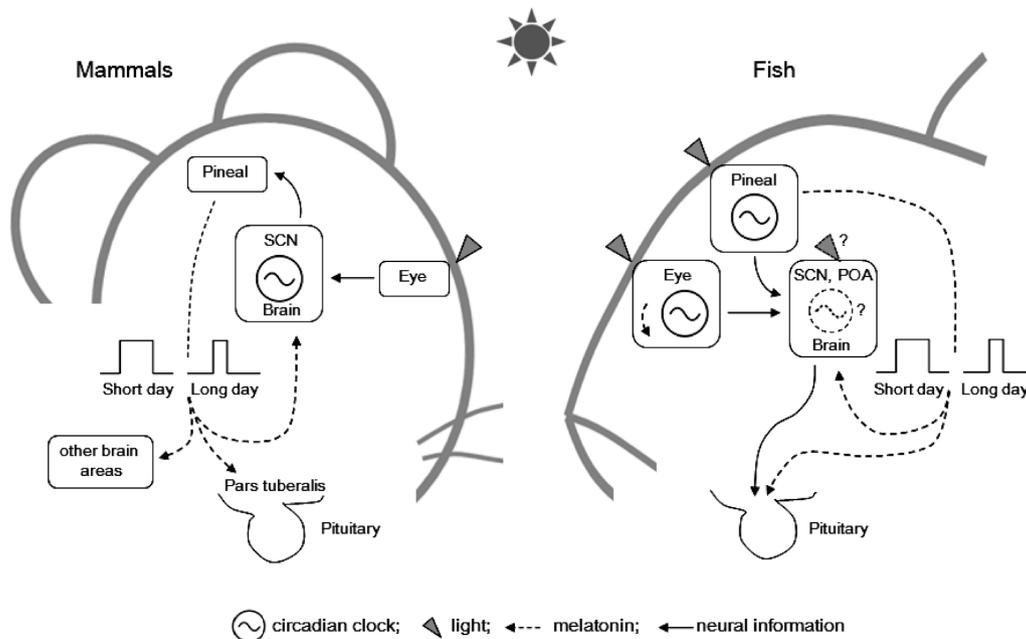


Figure 1. Photoperiodic and circadian control of neuroendocrine functions in mammals and fish (taken from Falcón et al. (2010) with modification). In mammals melatonin feeds back to the SCN and acts on the pars tuberalis of the pituitary and other brain areas to modulate seasonal neuroendocrine functions. In fish “?” in the brain indicates the hypothetical presence of brain circadian oscillators (SCN and others). Light might impact on other possible photosensitive and circadian structures in the ventral diencephalon (POA and hypothalamic area). In the fish retina, melatonin is an autocrine and/or paracrine factor, which is metabolized locally. POA, preoptic area; SCN, suprachiasmatic nucleus.

の体内時計の中核で、視交叉上核自体に発振する機能があり、他の領域のリズムを制御している。光周期の情報はここで概日時計 (circadian clock) の情報と統合されて、交感神経によって間脳の背側壁から突出してできた小嚢状の器官である松果体 (pineal organ) へと伝えられ、松果体ではメラトニン分泌という液性情報に置き換えられる。メラトニン (melatonin; MT) はトリプトファンからセロトニンを経て合成されるインドール骨格をもつホルモンで、松果体細胞では、暗期に視交叉上核から放出されたノルアドレナリンの刺激を受け、メラトニン合成を律速する酵素N-アセチルトランスフェラーゼ (NAT) が誘導されメラトニン合成が亢進する。したがって、メラトニン分泌は暗期に高く明期に低い明瞭な日周リズムを示す。循環血液中に出されたメラトニン情報は、視交叉上核にフィードバックされるとともに、脳下垂体の隆起部 (pars tuberalis) や脳内の他の領域に作用し、GnRHやLHの分泌を制御していると考えられている (Falcón et al., 2007, 2010)。メラトニンは、ヒツジやヤギなどの短日繁殖動物とウマなどの長日繁殖動物の生殖腺に対しては逆の作用があり、前者では、メラトニンの持続時間が長い場合に繁殖活動が活発になり、後者ではその逆になる。このように、哺乳類の季節繁殖には松果体が重要で、日長情報がメラトニンというメディエーターを介して生体内へ伝達され、繁殖における光周性反応を引き起こしている。

魚類における光受容とメラトニン分泌の仕組みは哺乳類に比べ複雑である。魚類では眼 (網膜; retina) と松果体の両方に概日時計とその同調に関与する光受容体が存在する (Fig. 1)。光刺激を受けた網膜と松果体は、それぞれの神経経路で日周情報を間脳の腹側部にある視索前野 (pre-optic area; POA) へと伝えると同時に、日周 (および季節) 情報をそれぞれメラトニン分泌情報に置き換える。網膜におけるメラトニン分泌は自己分泌 (autocrine) あるいは傍分泌 (paracrine) で、眼球内で代謝されるが、松果体で作られたメラトニンは血液中に放出され、各種器官のメラトニン受容体を介して標的細胞に作用すると考えられている (Falcón et al., 2010)。魚類のメラトニン受容体にはMT1, MT2, Mel 1cのサブタイプがあり、網膜、脳内の各部位、脳下垂体、腎臓、腸、血球、生殖腺、鰓などの諸器官に存在することが報告されている (Gaildrat and Falcón, 1999; Mazurais et al., 1999; Kulczykowska et al., 2006; Sauzet et al., 2008)。

魚類の視交叉上核や視索前野が概日時計の機能をもつかどうか現在のところ明らかでないが (Fig. 1)、これらはメラトニンが高度に結合する領域であることから (Ekström and Vanecek, 1992; Gaildrat and Falcón, 1999; Mazurais et al., 1999)、日長に関係した脳の活動がメラトニンにより調節されている可能性が高い。メラトニン投与されたサクラマス *Oncorhynchus masou* では、脳下垂体内のGnRHとLH量

は減少した (Amano et al., 2004)。また、メラトニンを視索前野へ脳内投与されたAtlantic croaker *Micropogonius undulatus* では、脳下垂体から放出されるLH量が減少した (Khan and Thomas, 1996)。後述するように、性中枢である視索前野から視床下部にかけて存在するいくつかの神経細胞は、神経ペプチド (GnRHなど) や生体アミン (ドーパミンなど) を産生し、脳下垂体へ投射した軸索を通して脳下垂体における各種ホルモン産生細胞を制御している。これらのことは、生殖を含む視床下部による脳下垂体の制御にメラトニン情報が介在している可能性を強く示唆するものである。一方、northern pike *Esox lucius* やニジマス *Oncorhynchus mykiss* の脳下垂体にはメラトニン受容体が存在し、放射性同位体を用いた結合実験でも腺性下垂体での強い結合が確認され、プロラクチン (PRL) や成長ホルモン (GH) の分泌に関してメラトニンの直接的な制御を受けていることが報告されている (Gaildrat and Falcón, 1999, 2000; Falcón et al., 2003)。メラトニンが脳下垂体のGTH分泌を直接制御していることを示した報告はないが、Atlantic croakerでは、培養脳下垂体にメラトニンを加えるとLHの放出が促進されることから、メラトニンの脳下垂体におけるGTH分泌調節への直接的関与が示唆されている (Khan and Thomas, 1996)。メラトニンは魚類の季節繁殖 (生殖年周期) のみならず、産卵期における生殖周期の調節にも深く関与していると考えられる。短日 (9L:15D) および長日 (18L:6D) 条件に置かれたEuropean seabass *Dicentrarchus labrax* の雄で、メラトニンと各種生殖関連ホルモンの血中濃度の日周変化が調べられた実験では、両群ともに、メラトニン量の最初の暗期における上昇に引き続いて血中LH量が上昇しピークとなる日周変動を示した (Bayarri et al., 2004)。哺乳類では繁殖期における日周メラトニン分泌リズムが日周GnRH/LH分泌リズムを制御することが示されており (Misztal et al., 2002)、この報告は魚類においても同様の制御機構が存在することを示唆している。さらに、産卵期に毎日産卵するシロギス *Sillago japonica* (古川ほか, 1991)、トビヌメリ *Repomucenus beniteguri* (Zhu et al., 1991)、gilthead seabream *Sparus aurata* (Meseguer et al., 2008) を用いた、明暗周期を変えて産卵時刻の変化を調べた実験では、シロギスの産卵は明期の開始時刻 (点灯) が合図となるのに対して、トビヌメリとgilthead seabreamでは暗期の開始時刻 (消灯) が合図となることが報告されている。これらの結果は、光周期が複数回産卵魚における産卵時刻の決定に深く関与していることを示している。産卵リズムは脳下垂体からのLHの分泌リズムに直接制御されていると考えられるので (GTHの項で後述)、光周期とGnRH/LH分泌リズムを結ぶ因子としてのメラトニンの中枢神経系に対する機能の解明が待たれる。

光情報は体内の概日リズムの情報と統合されてメラトニ

ンという液性情報に変換されるが、概日時計の発振は時計遺伝子とよばれる遺伝子群により支配されており、近年のショウジョウバエやマウスにおける生物時計の分子機構に関する研究の進展は著しい。ゼブラフィッシュにおいても *Period*, *Clock*, *Bmal*, *Cryptochrome* などの時計遺伝子が同定されている (Cahill, 2002)。魚類の生物時計の発振における時計遺伝子群の役割が解明されることにより、メラトニンの合成、分泌機構の理解が飛躍的に進むとともに、生殖内分泌系に対する制御機構もあわせて進むことが期待される。

2.2. キスペプチン

これまでBPG-axisにおいて最上位で生殖を制御している因子としてGnRHが知られていたが、近年、哺乳類において、GnRHのさらに上流で生殖機能を制御する因子、キスペプチン (kisspeptin) が発見された。キスペプチンは神経ペプチドで、オーファン受容体GPR54のリガンドとしてヒトの胎盤から同定された (Ohtaki et al., 2001)。オーファン受容体とは、遺伝子の存在だけが知られていて実際の生理機能が不明な受容体のことである。発見当初、メタスチンと命名されたが、現在ではこのペプチドをコードする遺伝子である *KiSS-1* にちなんでキスペプチンという名称が一般的である。これまでの哺乳類を中心とした研究によって、キスペプチンは視床下部のニューロン (神経細胞) で産生された後にGnRHニューロンの近傍へと運ばれ、GnRHの分泌を促すことで性成熟の引き金を引くことが明らかとなっている (Colledge, 2004)。また、正常な配偶子形成のためには、生殖腺でつくられた性ステロイドホルモンが脳にフィードバックし、GnRHニューロンのはたらきを調節する必要があるが、このフィードバック作用も、キスペプチンニューロンを介していることが示唆されている (Smith, 2008)。

発見以来、急速に進展している哺乳類でのキスペプチン研究に比べ、魚類を含むその他の脊椎動物のキスペプチンの構造や機能に関する研究は少ない。魚類では、*GPR54* の遺伝子クローニングはいくつかの魚種で報告されており、*KiSS-1* の遺伝子クローニングの報告は、最近までゼブラフィッシュ (Biran et al., 2008) とメダカ (Kanda et al., 2008) のみであった。ところが、ごく最近、スペインの研究グループにより European seabass から二つの *KiSS-1* 様遺伝子がクローニングされ、それぞれ *KiSS-1* および *KiSS-2* と名づけられ (Felip et al., 2008)、その後、ゼブラフィッシュとメダカでも *KiSS-2* 遺伝子が確認され (Kitahashi et al., 2009)、キンギョ *Carassius auratus* も *KiSS-1* と *KiSS-2* をもつことが報告された (Li et al., 2009)。各種動物のゲノム情報の比較により、*KiSS-1* および *KiSS-2* は一つの祖先型遺伝子から遺伝子重複によって生じたパラログ遺伝子であること、*KiSS-1* および *KiSS-2* は哺乳類以外の脊椎動物に共通して存在しているが、カモノハシを除く哺乳類は *KiSS-2* をもたな

いこと、また、トラフグ *Takifugu rubripes* と spotted green pufferfish *Tetraodon nigroviridis* は *KiSS-2* のみで、*KiSS-1* はもたないこともなども明らかとなってきた。合成 *KiSS-1* と *KiSS-2* を使った実験により、European seabass では *KiSS-2* が *KiSS-1* と比較してFSHとLH両者の分泌を強く誘導するのに対して、ラットでは *KiSS-2* のLH分泌促進は極めて低いことが示された (Felip et al., 2008)。また、ゼブラフィッシュでも、*KiSS-2* が主としてGTH合成に機能することが示唆されている (Kitahashi et al., 2009)。このように、魚類におけるキスペプチン研究は始まったばかりであるが、先行する哺乳類等とは異なったGnRH/GTH制御機能の存在も予測され、今後、生殖現象を制御するBPG-axisのなかで最も上位に位置する因子として、魚類における Kisspeptin-GPR54 システムの研究の急速な展開が予想されている。われわれもマサバで *KiSS-1*, *KiSS-2* (Selvarajほか, 2010) および *GPR-54* (未発表資料) の遺伝子クローニングに成功しており、現在、生殖周期における脳内の発現動態を解析中である。

2.3. 生殖線刺激ホルモン放出ホルモン (GnRH)

脳内において、環境情報や内在性リズムに基づく生理情報は最終的に視床下部で統合され、神経ホルモンや神経伝達物質等の神経情報として脳下垂体へと伝えられ、脳下垂体における生殖線刺激ホルモン (GTH) の合成、放出を促進する。視床下部の視索前野に存在する神経細胞で合成、分泌される主たる神経情報因子は、アミノ酸10個からなるペプチドホルモンであるGnRHで、現在 (2010年春) までに脊椎動物で14の分子種が同定、報告されている。GnRHの命名法は、慣習としてそのアミノ酸配列をもったGnRHが初めて同定された動物種の頭文字を付けて命名されており、たとえば、最初にブタ (Matsuo et al., 1971) とヒツジ (Amoss et al., 1971) から発見された哺乳類のGnRHはmGnRH (mammalian GnRH) とよばれ、また、サケ *Onchorhynchus keta* および gilthead seabream でそれぞれ初めて報告されたサケ型GnRH (Sherwood et al., 1983) およびタイ型GnRH (Powell, 1994) は、sGnRH (salmon GnRH)、sbGnRH (seabream GnRH) とよばれた。しかし、脊椎動物の複数のGnRH分子種は遺伝子重複によって生じたもので、3つのグループに分けられることが明らかとなり、最近では、3種類のGnRHパラログをそれぞれGnRH1、GnRH2、GnRH3とよぶことが提唱されている (Fernald and White, 1999)。パラログ遺伝子とは遺伝子重複によって生じた1つの生物種に複数存在する遺伝子のことで、脊椎動物におけるGnRHならびにGnRH受容体 (GnRHR) のパラログ遺伝子の系統進化と機能分化に関しては、英文の総説 (Kah et al., 2007; Sherwood and Adams, 2007) あるいは和文のわかりやすい解説 (大久保, 2007) があるので、興味のある方は参照されたい。

GnRHの3種のパラログのうち、GnRH3は両生類から哺乳

Table 1. Taxonomic distribution of GnRH forms in main teleost species.

Common name	Genus species	GnRH1	GnRH2	GnRH3	Reference
European eel	<i>Anguilla anguilla</i>	mGnRH	cGnRH-II		King et al., 1990
herring	<i>Clupea harengus pallasii</i>	hrGnRH	cGnRH-II	sGnRH	Carolsfeld et al., 2000
chum salmon	<i>Oncorhynchus keta</i>		cGnRH-II	sGnRH	Sherwood et al., 1983
rainbow trout	<i>Oncorhynchus mykiss</i>		cGnRH-II	sGnRH	Sherwood et al., 1984
goldfish	<i>Carassius auratus</i>		cGnRH-II	sGnRH	Yu et al., 1988
zebrafish	<i>Danio rerio</i>		cGnRH-II	sGnRH	Powell et al., 1996
African catfish	<i>Clarias gariepinus</i>	cfGnRH	cGnRH-II		Bogerd et al., 1994
medaka	<i>Oryzias latipes</i>	mdGnRH	cGnRH-II	sGnRH	Okubo et al., 2000
red seabream	<i>Pagrus major</i>	sbGnRH	cGnRH-II	sGnRH	Okuzawa et al., 1997
European sea bass	<i>Dicentrarchus labrax</i>	sbGnRH	cGnRH-II	sGnRH	González-Martínez et al., 2001
barfin flounder	<i>Verasper mosen</i>	sbGnRH	cGnRH-II	sGnRH	Amano et al., 2002
tiger puffer	<i>Fugu rubripes</i>	sbGnRH	cGnRH-II	sGnRH	Sherwood and Adams, 2007*
chub mackerel	<i>Scomber japonicas</i>	sbGnRH	cGnRH-II	sGnRH	Selvaraj et al., 2009
jack mackerel	<i>Trachurus japonicas</i>	sbGnRH	cGnRH-II	sGnRH	our unpublished data
bluefin tuna	<i>Thunnus orientalis</i>	sbGnRH	cGnRH-II	sGnRH	our unpublished data

* personal observation in Sherwood and Adams (2007)

乳類までの四足動物はもたず、魚類でのみ報告されている。魚類は2あるいは3種のGnRH分子をもち、魚種によりもっている分子種が異なる (Table 1)。たとえば、サケ科魚やキンギョ、ゼブラフィッシュはcGnRH-II (ニワトリII型GnRH=GnRH2) とsGnRH (サケ型GnRH=GnRH3) の2種をもつが、ニシン *Clupea harengus pallasii* はhrGnRH (ニシン型GnRH=GnRH1), cGnRH-II, sGnRHの3種を、またマダイ *Pagrus major* やトラフグはsbGnRH (タイ型GnRH=GnRH1), cGnRH-II, sGnRHの3種をもつ (Sherwood and Adams, 2007)。このうち、脳下垂体でのGTH放出に働くのは多くの魚種で1種類のみで、GnRH1をもつ魚種では、GnRH1の細胞体が性の中樞である視索前野や視床下部に存在し、軸索を脳下垂体に送っている。GnRH1をもたないサケ科魚やキンギョなどではGnRH3 (sGnRH) の細胞体が嗅球 (olfactory bulb, OB) から視索前野にかけて存在し、視索前野に存在するものがGTHの制御を行っている (Amano et al., 1991; Kim et al., 1995)。GnRH2は、哺乳類以外のほとんどの動物種で保持されており、魚類はcGnRH-IIをもつ (Table 1)。後述するように、魚類のcGnRH-II細胞体は中脳被蓋 (midbrain tegmentum, MT) に位置する神経核に局在し、軸索を脳内のあらゆる部位に投射しているが、その機能はまだ不明で、シクリッド科の *Haplochromis burtoni* などでの性行動との関連性が指摘されているにすぎない (White et al., 1995)。

マサバの脳内における3種GnRHの細胞体の分布をFig. 2に示す。3種GnRHのうちsbGnRHの特異抗体に免疫陽性の細胞体が視索前野に存在しており、さらにsbGnRHの神経軸索が脳下垂体内のFSHおよびLH分泌細胞に投射していることから、マサバでもマダイと同様にsbGnRHがGTH

放出に作用していると考えられる (Selvaraj et al., 2009)。マアジやクロマグロ *Thunnus orientalis* もマサバと同じGnRH分子種をもち (Table 1)、同様な脳内分布を示すことから (未発表資料)、これらの種でもsbGnRHが生殖に関与するGnRHであると推察される。サケ科魚でGTH放出の制御作用を示すsGnRHの細胞体は、マサバでは終神経節に、またcGnRH-II細胞体は中脳被蓋に存在し、おのおの、軸索を脳内のあらゆる部位に投射しており、それぞれ脳内において神経修飾物質として作用しているようであるが、その生理機能は不明である。

主要小型浮魚類のうちマイワシ *Sardinops melanostictus*、カタクチイワシ、サンマ *Cololabis saira* のGnRH分子種はまだ調べられていない。マイワシとカタクチイワシの属すニシン目のニシンがGnRH1としてニシン型GnRHをもち (Carolsfeld et al., 2000)、またサンマの属すダツ目のメダカはGnRH1としてメダカ型GnRHをもっていることから (Table 1)、マイワシとカタクチイワシはニシン型GnRHを、またサンマはメダカ型GnRHをもっている可能性がある。

2.4. ドーパミン

ドーパミン (dopamine) は中枢神経系に広く存在する神経伝達物質で、アミノ酸のチロシン (tyrosine) から2ステップで合成される生体アミン系ホルモンの一つである。いくつかの魚種でドーパミンはGTHの放出を強く抑制する効果があることが知られている。キンギョを使った実験でよく調べられており、ドーパミンは脳下垂体のGTH産生細胞に存在するドーパミン受容体を介して、直接GTH産生細胞に作用することでGTHの放出を抑制することが明らかにされた (Chang et al., 1990)。この機構はNorth African catfish *Clarias gariepinus* (De Leeuw et al., 1988)、ニジマス

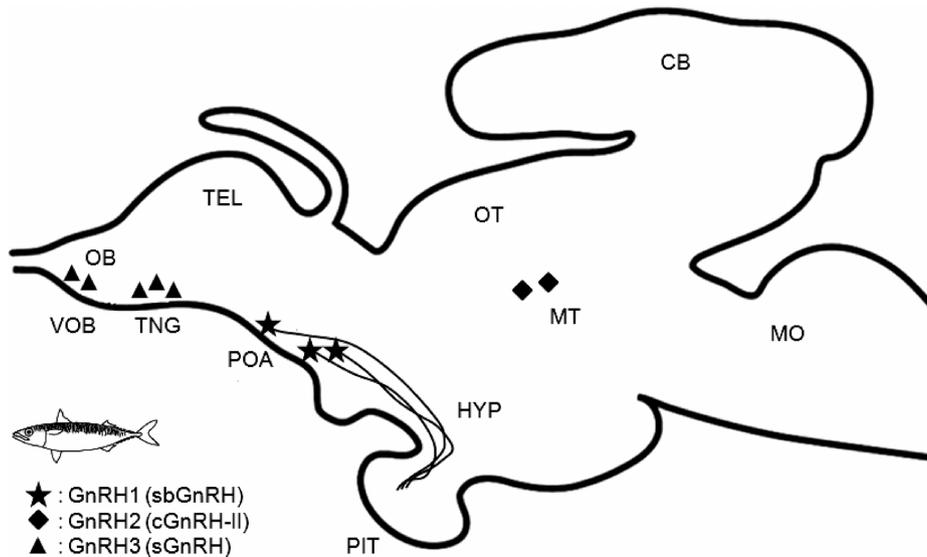


Figure 2. Distribution of GnRH1 (sbGnRH), GnRH2 (cGnRH-II) and GnRH3 (sGnRH) cell bodies on saggital view of the chub mackerel brain. sbGnRH neurons are localized in the POA, with fibers projecting to pituitary. CB, cerebellum; HYP, hypothalamus; MO, medulla oblongata; MT, midbrain tegmentum; NPO, nucleus preopticus; OB, olfactory bulb; OE, olfactory epithelium; OT, optic tectum; PIT, pituitary; POA, preoptic area; TEL, telencephalon; TNG, terminal nerve ganglion; VOB, ventral olfactory bulb.

(Vacher et al., 2000), Nile tilapia *Oreochromis niloticus* (Levavi-Sivan et al., 2006), European eel *Anguilla anguilla* (Dufour et al., 1988; Vidal et al., 2004), ボラ *Mugil cephalus* (Aizen et al., 2005) などでも確認されている。一方、ドーパミンはGnRHニューロンに対しても、受容体を介したGnRH放出抑制作用を示すことがキンギョで確認された (Yu et al., 1991)。このように、ドーパミンにはGTH産生においてGTH産生細胞に対する直接的抑制とGnRH放出抑制を介した間接的抑制の二つの機能が認められている。しかし、たとえばAtlantic croakerやstriped bass *Morone saxatilis*ではドーパミンのGTH放出抑制機構を欠くことが示されており (Copeland and Thomas, 1989; King et al., 1994), 必ずしも魚類一般に共通する機構ではない。コイ科魚類などでは、ドーパミンの拮抗剤 (antagonist) であるピモザイド (pimozide) やドンペリドン (domperidone) を投与すると、ドーパミンの作用が阻害されGTH放出が促進されるため、GTH放出促進効果の高い合成GnRH (GnRH analogue, GnRHa) と併用投与することにより、より効果的なGTH放出促進作用がもたらされる。コイ養殖の現場でよく使用されている技法である (Peter et al., 1988; Yaron et al., 1995)。

2.5. ニューロペプチドY (NPY)

ニューロペプチドY (neuropeptide Y; NPY) はC, N両末端がチロシン (tyrosine, Y) であることからこの名がついた36個のアミノ酸よりなる神経ペプチドである。NPYニューロンは、キンギョの脳では終脳と間脳を中心として脳内に広く分布し (Kah et al., 1989), 脳下垂体に対して成

長ホルモン (GH) とLHの放出促進作用を示す (Kah et al., 1989; Peng et al., 1993) とともに、脳下垂体に投射するGnRH軸索からGnRHを放出させる作用のあることが報告されている (Trudeau, 1997)。また、産卵期に摂餌量が低下、あるいは絶食する魚種がいるが、絶食中のサケ科魚では視索前野に分布するNPY神経細胞の活性が上昇し、また絶食させたEuropean seabassではLH放出に対するNPYの促進効果が増大する (Silverstein et al., 1998; Cerda-Reverter et al., 1999)。このように、NPYは個体の成長、摂餌、生殖を結ぶ軸を制御する因子の一つである。一方、NPYニューロンはステロイドフィードバックの制御を受けていることが知られており、たとえばキンギョ視索前野におけるNPYのmRNA発現量は、エストラジオール-17 β (E2) あるいはテストステロン (T) の処理を受けた場合、数倍上昇する (Peng et al., 1994; Trudeau, 1997)。

2.6. ガンマアミノ酪酸 (GABA)

ガンマアミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid; GABA) は脊椎動物の脳に広く、大量に存在する神経伝達物質の一つで、グルタミン酸 (glutamic acid) より合成される。キンギョでは、GABAはGnRHの放出を促進する (Sloley et al., 1992) と同時に、ドーパミン放出を抑制する (Trudeau et al., 2000) ことによりLHの放出を促進する。ニジマスでも、FSHおよびLHの放出促進効果が報告されており、脳下垂体内のGTH産生細胞にGABAニューロンの軸索の投射が認められることから、GABAはGTH放出を直接調節していることが示唆されている (Manaos et al., 1999)。GABAのGTH放出促進作用およびGABAの合成はステロイドフィード

バックの制御を受けていることがキンギョ (Trudeau, 1997) とニジマス (Mánaños et al., 1999) で報告されている。NPYやGABAのGTH調節作用に関する研究はほとんどキンギョを中心に行われている。後述するように、魚種によってFSHとLHの機能が異なる可能性があるため、GTHの放出制御にかかわるこれら神経ペプチドや神経伝達物質の魚種ごとの詳細な機能解析実験が必要である。

2.7. 生殖腺刺激ホルモン抑制ホルモン (GnIH)

GTHの放出を促進するホルモンとしてGnRHの存在が1970代から知られていたが、2000年に筒井らにより、生殖腺刺激ホルモンの放出を抑制するペプチドがウズラの脳から同定され、生殖腺刺激ホルモン抑制ホルモン (Gonadotropin Inhibiting Hormone, GnIH) と名づけられた (Tsutsui et al., 2000)。このペプチドは視床下部から脳下垂体に投射するニューロンに局在しており、培養したウズラの脳下垂体前葉で濃度依存的にGTHの放出を抑制することからこの名がついた。これは、GTHの放出を抑制する、視床下部の液性因子の最初の発見となった。ウズラではGnIHニューロンにメラトニン受容体の一つであるMel 1cが存在し、この受容体を介してメラトニンがGnIHの発現を誘導していることが明らかにされた (Ubuka et al., 2005)。すなわち、ウズラの短日下での生殖腺の退行は、短日条件下で放出量の高まったメラトニンによるGnIHの発現の増加により引き起こされるものと考えられた。さらに、GnIHの受容体も同定され、その局在が調べられた結果、GnIHは脳下垂体に直接作用してGTHの放出を直接抑制しているとともに、GnRHニューロンにも作用してGTHの放出を抑制していることが示唆された (Yin et al., 2005)。その後、GnIHの同族ペプチド (ホモログ) が哺乳類でも報告され、GTHの放出を抑制することが明らかとなった (Kriegsfeld et al., 2006)。

一方、魚類では、キンギョでGnIHホモログ (gfLXPpFa) が初めて同定され、そのニューロンは視床下部に局在していた (Sawada et al., 2002)。しかし、ヒメマス *Onchorhynchus nerka* の脳下垂体培養細胞を使った実験で、gfLXPpFaはFSHとLHに対する放出促進作用をもつことが示され (Amano et al., 2006)、哺乳類および鳥類におけるGTH抑制作用と逆の機能をもつことが示唆された。GnIHの発見は、メラトニンを介す光情報により調節される脊椎動物のBPG-axisの理解に新しい研究分野を与えたといえる。しかし、魚類における報告は極めて乏しく、早急な研究の進展が望まれる。

3. 脳下垂体の内分泌因子

配偶子形成のBPG-axisにおいて、脳下垂体でつくられる主要内分泌因子は生殖腺刺激ホルモン (GTH) である。GTHは脊椎動物の配偶子形成制御における最重要因子でありながら、魚類GTHの機能に関する知見は、現在にお

いてもサケ科などの限られた魚種にのみ限定されており、不明な点が多い。ここでは、サケ科魚類における基本的知見とともに、マダイ、マサバなどで得られた最近の知見を紹介する。また、脳下垂体の内分泌因子ではないが、生殖腺におけるGTH受容体の発現調節によるGTHの機能制御に関する、ホシササノハベラ *Pseudolabrus sieboldi* を用いた筆者らの研究例を紹介する。

3.1. 生殖腺刺激ホルモン (GTH)

GTHは分子量25,000–45,000程度の脳下垂体でつくられる糖タンパク質ホルモンで、FSH (濾胞刺激ホルモン) とLH (黄体形成ホルモン) の2種がある。FSHとLHは、 α 鎖と β 鎖の2種類のサブユニットが非共有結合したヘテロ2量体で、 α 鎖はFSHとLHに共通であり、 β 鎖によりホルモンの特異性が規定される。GTHは生殖細胞の増殖分裂、成長、成熟を制御している最も重要なホルモン因子で、それぞれの受容体 (FSHRおよびLHR) を介して直接あるいは間接的に配偶子形成を制御している。魚類においては、これまでに複数の魚種で2種GTHの遺伝子クローニングが行われ、演繹アミノ酸配列が明らかにされるとともに、繁殖サイクルにおける脳下垂体内のmRNAの発現パターンが解析されてきた。しかしタンパク質レベルで2種類のGTHが単離、精製されたのはサケ科魚類 (Suzuki et al., 1988)、コイ *Cyprinus carpio* (Van Der Kraak et al., 1992)、マダイ (Tanaka et al., 1993)、カツオ *Katsuwonus pelamis* (Koide et al., 1993)、メバチ *Thunnus obesus* (Okada et al., 1994)、カンパチ *Seriola dumerili* (García-Hernández et al., 1997)、mummichog *Fundulus heteroclitus* (Shimizu and Yamashita, 2002) および Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* (Weltzien et al., 2003) などの魚種に限られている。サケ科魚類では精製GTHを使って抗体が作製され、血液中のFSHとLHの濃度測定系が開発されたが、それ以外の魚種で2種のGTHの測定系が開発された例は、最近に至るまでない。特にFSHの脳下垂体中の含量は少ないことが多く、十分量のFSHが手に入らないためFSHについての研究が進展していない。ただし、最近、遺伝子工学の技術を利用した組み換えタンパク質によるFSHの抗体作製と測定系がNile tilapiaで開発されており (Aizen, et al., 2007)、他魚種における応用が期待されている。

魚類における2種類のGTHの機能研究は、主にサケ科魚を中心にして展開され、これまでに分泌細胞の同定、血中量測定による分泌動態、生物活性の評価等が行われた。すなわちサケ科魚類では、先に分泌されたFSHにより卵濾胞組織でE2が合成され、E2は主に肝臓の肝細胞で卵黄の前駆タンパク質であるピテロゲニン (vitellogenin, Vtg) 合成を促進する。Vtgは血液を通過して卵母細胞に達すると卵細胞膜表面のVtg受容体 (VtgR) を介して、飲作用 (endocytosis) により卵細胞質内に取り込まれる。ニジマスの培養卵母細胞を使った実験では、FSHはVtgの卵細胞への取

り込みも促進することが報告されている (Tyler et al. 1991). 卵黄形成が終わると、次に脳下垂体から LH が分泌される。LH は卵濾胞組織において、卵成熟誘起ホルモン (maturation-inducing hormone; MIH, maturation-inducing steroid; MIS ともいう) の合成を誘導し、MIH により卵は最終成熟 (final oocyte maturation, FOM) する。このようにサケ科魚類の雌魚では、FSH が卵黄の合成と蓄積を、LH が卵の最終成熟に機能することが明らかにされた (Planas and Swanson, 2007). また、雄魚でも雌と同じような分泌動態を示し、FSH が増殖分裂と減数分裂を含む精子形成過程の前半に、LH が精子変態と運動能獲得を含む精子形成過程の後半に機能すると考えられている (Planas and Swanson, 2007).

サケ科魚類の場合、発達する卵巣卵は 1 群のみで、すべての卵は同期して卵黄形成が進行し、卵黄形成終了後、一斉に卵成熟し、排卵、産卵が 1 回行われる。一方、多くの魚種は非同期発達型の卵巣卵発達様式をもち、産卵期に繰り返し産卵を行う。このような産卵様式をもつ魚種としてマダイが取り上げられ、GTH の生物活性や生殖周期に伴う GTH の mRNA の定量が試みられた。その結果、マダイ LH は E2 や MIH などのステロイド産生能が高く、また卵成熟を濃度依存的に誘起すること、脳下垂体中の mRNA 量は生殖腺の発達時期、産卵期ともに高いことなどが明らかとなった。それに対し、FSH はステロイド産生能が低く、卵成熟誘起活性をもたないこと、さらに雌における脳下垂体中の mRNA 量は生殖周期を通じて低いことが明らかとなり、マダイ雌では LH が卵黄形成および卵成熟の両方を促進することが示唆された (Kagawa et al., 1998, 2003). マダイでは FSH の血中測定系が開発されていないのでその分泌動態は不明であるが、以上の研究より、マダイの FSH の機能はサケ科魚類とは大きく異なることが示された。最近、われわれはマサバの脳下垂体から FSH と LH を精製し、マサバの各種卵濾胞に対する *in vitro* ステロイド産生能を調べた。その結果、マサバの FSH と LH はともに E2 産生を促進する機能をもち、一方、LH は FSH に比べ高い MIH 産生能を示すことが明らかとなった (金子ほか, 2009). すなわち、マサバ雌では、FSH は卵黄形成促進に、一方 LH は卵黄形成と卵成熟の両方の促進に機能していることが示唆された。FSH と比べ、LH の機能に関する知見の蓄積は比較的多く、他の魚種でも、サケ科魚類やマダイ、マサバと同様に、雌魚では卵成熟を促進するということが一般的である。しかし、FSH に特異的な作用というものは報告されておらず、非同期発達型の卵巣卵発達様式をもつ同じスズキ目のマダイとマサバにおいても、FSH の機能における差異が示唆されるように、FSH がどのように生殖腺の発達を調節しているのかよくわかっていない。現在われわれは、精製したマサバの FSH と LH を用いて、その測定系の開発を試みている。分泌動態が解明されれば、生物活性とあわ

せてそれらの機能の詳細が明らかになると考えている。

このように、魚類における 2 種類の GTH の機能の詳細はまだ不明であるが、少なくとも卵成熟には LH が関わっているため、LH の分泌されるタイミングがその種の卵成熟、排卵および産卵のタイミングを決めているといつてよい。マサバの雌は飼育下では卵黄形成は進行するが卵成熟が起こらない。すなわち、飼育下では脳下垂体内に LH は蓄積されるが、卵成熟のための大量分泌が起こらないのである。このような親魚に、強い生物活性をもつ GnRHa を投与すると、脳下垂体に作用して自身の LH の放出を促し、飼育下で産卵するようになる。水温が 17°C に達する頃、マサバの卵黄形成はほぼ終了するが、このような個体に GnRHa を投与すると、産卵群は 1 ヶ月以上にわたりほぼ毎日産卵し、水温が 23°C 付近になると終了する。投与した GnRHa は数日以内に分解されるので、マサバの長期にわたる水槽内産卵は、マサバ自身の GnRH 合成・分泌リズムに基づいた BPG-axis の制御のもとに進行しており、海域における自然産卵の産卵生態を反映していると考えられる。産卵しているマサバの 1 日における卵巣卵の発達動態を Fig. 3 に示した。マサバの卵成熟における核の移動 (germinal vesicle migration; GVM) は夜明け前から始まり、日中から夕刻にかけて核膜の消失 (卵核胞崩壊—germinal vesicle breakdown; GVBD) と吸水が進行する。排卵とそれに引き続いて行われる産卵は 23 時を中心とした数時間の間に起こる (Shiraishi et al., 2005, 2008). この間、次の卵群では卵黄形成が進行する。排卵後の卵巣内には排卵後濾胞 (postovulatory follicles) が残り、時間経過とともに、退行、消滅する。LH の作用をもつ hCG (ヒト絨毛性生殖腺刺激ホルモン) や GnRHa の投与実験から、マサバの卵黄形成を終了した卵は、LH の刺激を受けると水温 19~20°C では約 33 時間で排卵されるので、LH の放出は前日の正午頃を中心とした日中に起こると推定している (Shiraishi et al., 2008).

最近われわれは、対馬暖流系群マサバの産卵頻度 (spawning frequency) を排卵後濾胞の形態と卵巣卵の発達段階より算定し、その結果、産卵頻度は 16.9% で、1 尾のマサバ親魚が平均 5.9 日に 1 回、産卵期に 8.5 回産卵するという結果を得た (Shiraishi et al., 2009). 一方、飼育環境下で同様の調査を 2 回行った結果、産卵頻度は 44.4% および 53.3% となり、これは 1 尾のマサバ親魚が平均してほぼ 2 日に 1 回産卵していることを示しており、また連日産卵を行った組織像を示す個体も複数認められた (松山ほか, 2007). マサバ 1 尾の連日産卵は、ミトコンドリア DNA を用いて母子判定を行った産卵実験でも確認された (松藤ほか, 2009). 飼育実験で用いた親魚は栄養状態もよく、確実に採集できるため、産卵頻度は天然群とは異なったが、いずれにしてもマサバは 1 ヶ月以上にわたる産卵期間中、連日産卵を含む活発な産卵を行う魚種であり、その産卵周

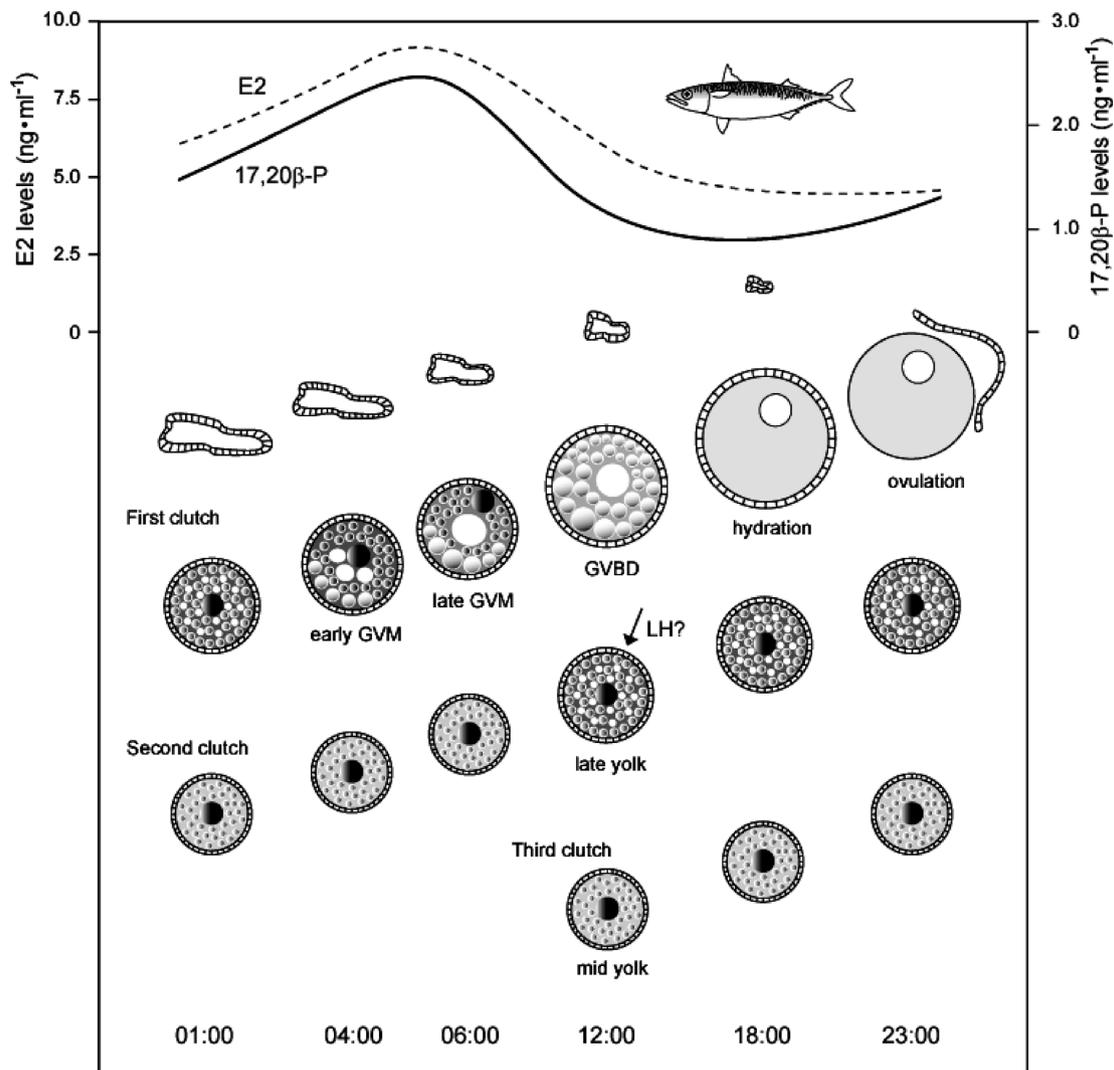


Figure 3. Diagrammatic representation of diurnal changes of oocyte composition and serum levels of E2 and 17,20β-P in mature chub mackerel. Our previous *in vivo* studies on hCG and GnRHa injection (Shiraishi et al., 2005, 2008) suggest that endogenous LH surge from the pituitary occurs around at 12:00 h, 33 hours prior to ovulation (arrow). GVBD, germinal vesicle breakdown; GVM, germinal vesicle migration.

期は上記の LH 放出リズムにより制御されていることが示された。

3.2. 生殖腺刺激ホルモン受容体

サケ科魚類では、同じ発達段階にある 1 群の卵群に対して異なる時期に一過性に分泌される FSH と LH により、卵黄形成と卵成熟がそれぞれ進行する。一方、複数回産卵を行うマダイやマサバなどでは、卵黄形成と卵成熟が繰り返し行われるため、FSH と LH の分泌も短期間に繰り返し行われ、卵巣内に同時に存在する種々の発達段階の卵群は、FSH と LH に同時に曝露されていると考えられる。このような状況のもと、ある卵群は FSH の制御を受け、ある卵群は LH の制御を受け、あるいは両者の制御のもとに卵黄形成や卵成熟が、卵の発達段階に応じて進行していく場合、

受け手側による調節、すなわち GTH 受容体による調節がきわめて重要な役割をもつと考えられる。非同期発達型の卵巣における GTH の受容体側からみた、卵の成長、成熟制御に関する報告はほとんどないが、最近われわれは、毎日産卵を行うホシササノハベラで、詳細な解析を行った。

ホシササノハベラは、秋期の産卵期に飼育下で 1 尾の雌が 1 ヶ月以上にわたり、明け方に雄との間で毎日ペア産卵を行うベラ科魚で、卵巣卵の発達には規則正しい日周リズムが認められる (Matsuyama et al., 1998)。この飼育系の優れた点の一つは、卵細胞における卵黄形成や卵成熟の時刻が決まっているため、目的とするステージの卵細胞や脳などの器官の採集が正確にできることである。たとえば、6 時に採集した場合、最も発達した第 1 卵群は吸水の完了し

た排卵直前の成熟卵で、次の卵群は卵黄形成後期にある (Fig. 4)。産卵はおおむね6-9時に行われ、産卵直後の第1卵群は卵黄形成後期に達している。脳下垂体中のFSHとLHのmRNA発現量はともに12-18時に高まり、そのときの第1卵群は卵黄形成後期から核移動前期の卵成熟開始前後にあり、第2卵群は卵黄形成初期から卵黄形成中期の、卵黄形成の活発な卵であった (Fig. 4) (Ohta et al., 2008)。

一方、各発達段階にある卵濾胞におけるFSH受容体 (FSHR) のmRNA発現量は卵黄形成初期から卵黄形成中期の卵で最大となり、LH受容体 (LHR) のmRNA発現量は卵黄形成後期から核移動前期にピークを示した (Fig. 5) (Kitano et al., 2008)。これらの結果は、FSHとLHが短い時間帯のなかで連続的に放出されたとしても、卵側に発達段階に応じた受容体が形成され、卵黄形成卵ではFSHRが、

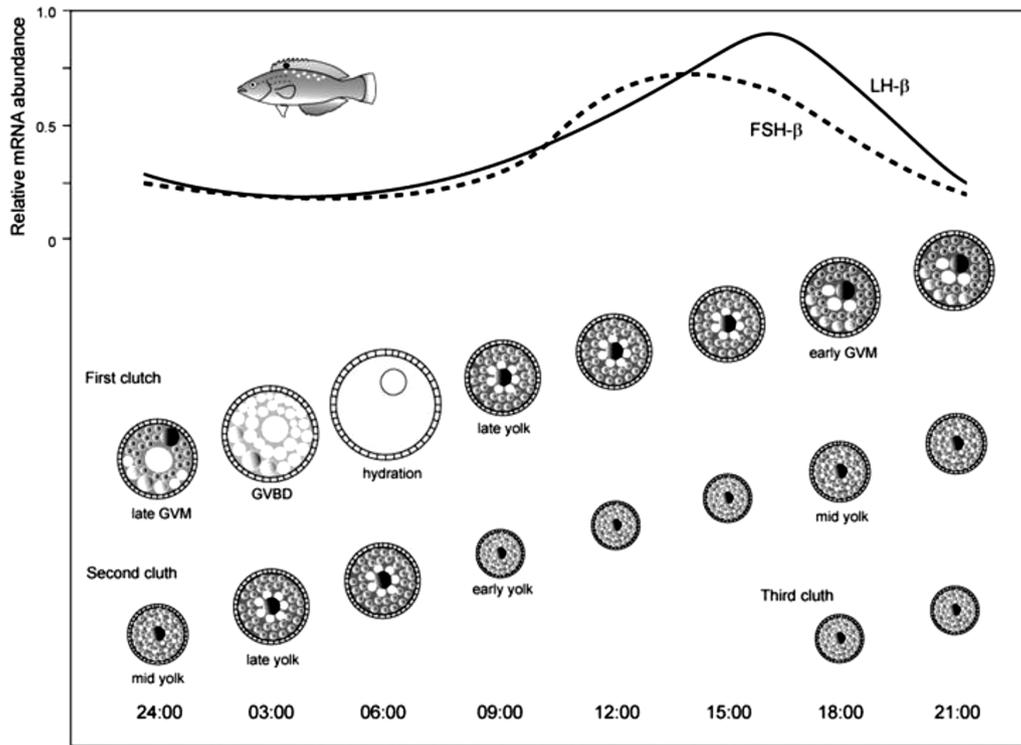


Figure 4. Diagrammatic representation of diurnal expression profiles of the FSH- β and LH- β subunit mRNAs in the pituitary of female bambooleaf wrasse.

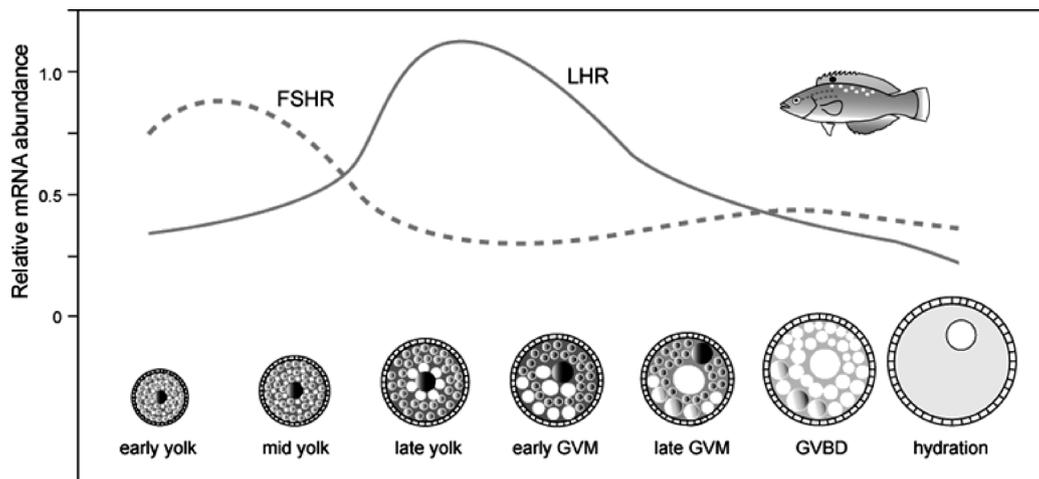


Figure 5. Diagrammatic representation of expression profiles of the FSHR and LHR mRNAs in the ovarian follicles at different developmental stages of female bambooleaf wrasse.

また卵成熟時にはLHRが形成され、それぞれFSHとLHが作用することにより、卵黄形成と卵成熟が進行することを示唆している。

以上、ホシササノハベラの研究結果は、非同期発達型の卵巣卵発達様式をもつ魚種における卵母細胞のGTH制御機構を、GTH受容体の発現動態から説明する仮説であるが、タンパク質レベルの研究ではない。現在、マサバではGTHおよびGTHRの遺伝子クローニングがほぼ終了し、それらの発現動態を解析中である。マサバではすでに精製GTHがあるので、2種GTHの測定系の開発に加え、GTH受容体の組み換えタンパク質および抗体作製、2種GTHとの結合特性などの解析を通して上記仮説を検証したい。

4. 生殖腺の内分泌因子

GTHの刺激を受けて、卵細胞を取り囲む卵濾胞組織では性ステロイドホルモンが合成される。ここでは魚種におけるGTHによる性ステロイドホルモンの合成調節機構を概説するとともに、配偶子形成調節以外の性ステロイドホルモンの生殖における機能と、同じく卵濾胞組織でつくられるプロスタグランジンの機能について紹介する。

4.1. 性ステロイドホルモン

ステロイドホルモンはステロイド環を骨格にもつホルモンの総称で、コレステロールより合成されたプレグネノロン (pregnenolone; P5) がすべてのステロイドホルモンの基幹ステロイドとなる。ステロイドホルモンはコルチコイドと性ステロイドホルモンに大別され、一般に、主に生殖腺でつくられるプロゲステン、アンドロゲンおよびエストロゲンを性ステロイドホルモンと呼ぶ。魚種における性ステロイドホルモンの主な役割は、雌では卵黄形成促進、卵成熟の誘起で、雄では精子形成促進、精子の運動能獲得に関与していることが知られている。魚種の生殖腺における性ステロイドホルモンの合成は主としてGTHに制御されており、上述したようにサケ科魚種の雌では、FSHの作用により卵黄形成卵の卵濾胞組織でE2が、また、卵黄形成が終了した卵の卵濾胞組織ではLHの作用によりMIHである17,20 β -ジヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン (17,20 β -P) が合成され、それぞれ卵黄形成と卵成熟を促進する。このように、卵黄形成から卵成熟にかけて、卵濾胞組織においてステロイドの合成系がE2合成系からMIH合成系へとシフトする。逆にいうと、このシフトが起こらないと卵成熟は起こらない。

マサバとトラフグでも卵黄形成期の卵濾胞組織では、P5からの合成経路は異なるもののE2が合成され、肝臓におけるVtgの合成を促進する (Fig. 6)。トラフグではE2に加え、さらに11-デオキシコーチゾル (17, 21-P) が合成される。卵黄蓄積が終了すると、新たに放出されたGTH (おそらくLH) の作用により、ステロイド代謝酵素であるC17,20-lyaseの活性低下と20 β -HSDの活性化がもたらされ、

E2の合成は停止し、代わってMIHが新たに合成される。マサバのMIHはサケ科魚種と同じ17,20 β -Pで、17 α -ヒドロキシプロゲステロン (17-P) から20 β -HSDの作用により合成される (Matsuyama et al., 2005)。一方、トラフグのMIHは17,20 β ,21-トリヒドロキシ-4-プレグネン-3-オン (20 β -S) で、卵黄形成中から活発に合成されていた17, 21-Pが、同じく20 β -HSDの作用により20 β -Sへと転換されることにより作られる (Matsuyama et al., 2001)。このように、ステロイドの合成経路やMIHの種類は魚種によって異なるが、C17,20-lyaseの活性低下と20 β -HSDの活性化が、魚種の卵成熟に必須のE2合成系からMIH合成系へのシフトに際して起こる共通した機構である (Matsuyama, 2007)。

血中のステロイドホルモン濃度は魚種の成熟状態を示す指標としてしばしば使われる。産卵中のマサバの血中17,20 β -P量とE2量はともに似たような変動傾向を示し、明け方から早朝にかけてピークとなる (Fig. 3)。このとき、第1卵群は核移動期に、第2卵群は卵黄形成中期にあり、これらの卵濾胞組織でそれぞれ17,20 β -PとE2がつくられるため、このようなホルモンの血中動態を示すことになる。したがって、フィールド調査でホルモン量から成熟状態を推定するような場合には、採集時間帯が重要となる。マサバに限らず、マアジ、マイワシなども定時に産卵を行う産卵リズムをもっていると考えられ、これら夜間操業で漁獲する魚種では特定の成熟段階の個体を採捕することができないため、産卵周期を通してのホルモン量測定は難しく、また測定したホルモン量も、その個体の成熟状態の一時的側面を示しているにすぎない。

配偶子に対する直接的作用に加え、性ステロイドホルモンの生殖における機能としてステロイドフィードバックが知られている。BPG-axisにおいて性ステロイドなどの下位のホルモンがGnRHやGTHなどの上位のホルモンの分泌を促進的、あるいは抑制的に調節する機構をそれぞれ正のフィードバック (positive feedback)、負のフィードバック (negative feedback) という。魚種の配偶子形成におけるステロイドフィードバックに関する報告は少なくないが、魚種や成長、成熟段階、あるいは同一魚種でも性などによりその作用は異なっている。ここでは血中の2種GTH量が測定できるティラピアの雌における研究例 (Levavi-Sivan et al., 2006) を紹介する。ティラピアは産卵期に繰り返し産卵を行う非同期発達型の卵巣卵発達様式をもち、また、コイ科魚種と同様に、GTH産生細胞に存在するドーパミン受容体を介したドーパミンのGTH放出抑制機構をもつ。この研究では、E2あるいは17,20 β -Pを *in vitro* および *in vivo* で投与したときの、脳下垂体におけるGnRH受容体、ドーパミン受容体、FSH、LHの各mRNA量の発現動態とFSHおよびLHの放出量が解析された。その結果、卵黄形成初期における低濃度E2によるGnRH受容体mRNAの増加はFSH放出のpositive feedbackとして作用すること、卵

魚類の生殖周期の内分泌制御機構

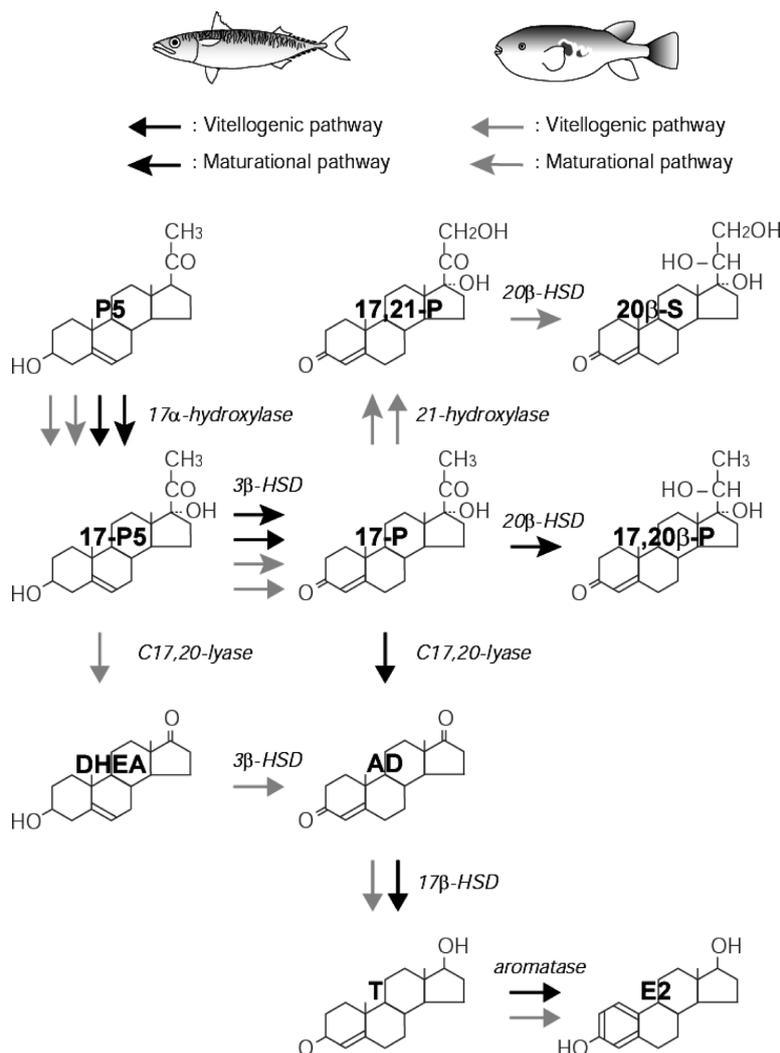


Figure 6. Steroidogenic pathways in the ovarian follicles of chub mackerel and tiger puffer during vitellogenesis and final oocyte maturation.

黄形成期における増大する血中E2量は、ドーパミン受容体mRNAの増加とLH β -mRNAの抑制をもたらし、LH放出のnegative feedbackとして作用すること、卵黄形成終了時における高いE2量の状態では、次の卵群のためのFSH合成の増加が起こること、などが示された。さらに、卵成熟初期における低い17,20 β -Pレベルは、ドーパミン受容体mRNAの増大をもたらし、LH放出のnegative feedbackとして作用するとともに、次の卵群の加入に備えてのLH β -mRNAの増大をもたらすことなどが示唆された。一方、卵成熟後期に相当する高い17,20 β -Pレベルは、negative feedbackとしてLH β -mRNAの減少をもたらすと同時に、ドーパミン受容体mRNAの減少およびGnRH受容体mRNAの増大をもたらしたが、これらは次の卵群の加入に対する準備であると考えられている。BPG-axisにおけるステロイドフィードバックは、魚類の多様な成熟・産卵様式に応じた

それぞれのシステムが存在しており、共通した理解はまだ得られていない。しかし、上述したように、GnRHの上位にあるキスペプチンもステロイドのフィードバック制御を受けている可能性もあり、さらに複雑なものになると考えられる。

また生殖における性ステロイドホルモンの重要な役割として、産卵行動の際のフェロモンとして機能することがキンギョを用いた実験系で明らかにされているが、次のプロスタグランジンの項で簡単に紹介する。

4.2. プロスタグランジン

プロスタグランジン (prostaglandin, PG) は高度不飽和脂肪酸の一種であるアラキドン酸から生合成される一群の生理活性物質で、生殖腺のみでなく種々の組織で産生され、血栓形成、炎症反応、睡眠覚醒の調節、痛覚の感受性など多岐にわたる生理活性をもつ。魚類の卵成熟時には、脳下

垂体より分泌されるLHの作用により、卵濾胞組織においてMIHが合成され卵成熟が誘起されるが、一方で、LHは卵濾胞組織においてPGの合成を促進し、PGは排卵を誘起する主要な因子として作用する (Lubzens et al., 2010)。排卵過程にはPGのみではなく、種々のタンパク質分解酵素を含む複数の因子が作用するが (Lubzens et al., 2010)、この排卵時につくられたPGは、雌雄の産卵行動において重要な役割を果たすことがいくつかの魚種で知られている。キンギョの場合、排卵後も卵巣内で引き続き産生されたPG (PGF2 α) が脳に作用し、PGが雌における放卵のための一連の性行動を誘起する生理的引金となる。また、キンギョのMIHは17,20 β -Pであるが、17,20 β -Pは卵成熟を誘起するとともに、水中に放出されて雄に対するフェロモンとして作用し、17,20 β -Pを受容した雄ではLHの大量分泌が起こり、精液量が増加する。一方、水中にも放出されたPGは、17,20 β -P同様、雄に対するフェロモンとして作用し、PGを受容した雄では放精のための性行動が始まる (小林, 2002; Stacey and Sorensen, 2007)。

PGによる性行動の誘起は数種の淡水魚で報告されているが、サケ科魚類ではPGによる性行動の誘起効果はみられず、また、海産魚に関する報告はない。さらに、キンギョ以外の魚種において雌の性行動と性ホルモン関係について詳しく調べた研究はほとんどない (Munakata and Kobayashi, 2010)。配偶行動は、次世代を最大限に残すために、適切なタイミングで受精が行われるように進化してきた生殖周期の中の重要な過程である。すなわち、配偶行動が適切に行われないと、順調な発達を遂げた配偶子であっても、次世代の生存へと結びつかない。マサバ (Shiraishi et al., 2005) などでも実験的に確認された排卵後過熟とは、卵巣内に排卵された卵の卵巣腔内での滞留時間に伴い、受精率が急激に低下する現象である。これは、自然産卵においては、排卵後、速やかに産卵行動が行われることが、高い受精率の実現に必須であり、孵化する仔魚の数を保障することを意味している。マサバ産卵群における、夜間の排卵に引き続いて起こる同期した産卵行動は、たとえばキンギョのように、雌のMIHやPGが雄の精液量増加や性行動誘起のためのフェロモンとして作用していると仮定すれば、理解しやすい。海産魚、特に実験しやすい小型浮魚類を対象とした産卵行動を制御する化学シグナルについての研究は、主要漁獲資源の産卵生態を多角的に理解するうえで、今後の資源学研究における興味ある課題の一つになると考えられる。

5. 生殖内分泌系の温度応答、栄養状態と生殖

水温変化も光周期と同じく、体内の生理情報と統合され、生殖内分泌系を介して影響していると考えられる。たとえば、春季の水温上昇が成熟を促進し、夏季の高水温が成熟を抑制する春産卵型のホンモロコ *Gnathopogon caeruleus*

(清水, 2010) の雄では、性成熟の進む15°Cに置かれた個体の脳内GnRH量 (この場合sGnRH) は、精巢の退行する30°Cにおけるものより高い値を示した (Okuzawa et al., 1994)。春産卵型のマダイ雌で17°Cと24°Cに置かれた群を比較した結果、17°C群は産卵を続ける一方で、24°C群では産卵が停止するとともに、脳内sbGnRHのmRNA量および脳下垂体内のGnRH受容体とLH- β のmRNA量は低下した (Okuzawa et al., 2003)。また、キンギョは13°C以下で飼育すると卵黄形成が終了したままで長期間維持でき、昇温処理によりGTHが放出され、随時、排卵・産卵を誘発できる (Stacey et al., 1979) ことが知られているが、これらは、水温情報が魚類のGnRHニューロンを介して性成熟を制御していることを示すものである。このように、温度は魚類の性成熟を制御する環境シグナルとして作用しているが、水温情報がどのように受容され、体内の生理情報とともに統合された後、GnRHやGTHの合成、分泌をどのように制御しているのか、その機構は明らかでない。

一方、水温は変温動物である魚類の摂餌や体成長、栄養蓄積に強い影響を及ぼすため、初回成熟 (puberty) や産卵能力を間接的に制御する要因として生殖に深くかかわっていると考えられる。体のエネルギー蓄積状態を神経系に伝える因子として、近年レプチン (leptin) とグレリン (ghrelin) が報告された。レプチンは脂肪組織より分泌されるホルモンで、最初、遺伝性肥満マウスの病因遺伝子として同定された (Zhang et al., 1994)。レプチンは末梢の脂肪貯蔵量を視床下部に伝達し、視床下部の摂食・代謝調節因子を制御して体重を一定に保つ働きを有している。一方、グレリンはラットの胃から単離・同定されたホルモンで (Kojima et al., 1999)、脳下垂体に働き成長ホルモン (GH) 分泌を促進するとともに、視床下部に作用して食欲を増進させる機能がある。すなわち、脂肪組織から分泌されるレプチンが体のエネルギーの蓄積状態を伝える因子として、また胃から分泌されるグレリンが空腹状態を神経系に伝える因子として拮抗的に機能している。

最近マウスで、視床下部のKiSS-1ニューロンにレプチン受容体が存在するとともに、レプチンはKiSS-1のmRNAを増大させることが報告された (Smith et al., 2006)。これはKiSS-1ニューロンがレプチンの標的細胞の一つであるとともに、レプチンの欠乏 (すなわち栄養状態の低下) が生殖を抑制していることを示している。さらに、マウスで、視床下部にあるレプチン受容体をもつ腹側前乳頭核 (ventral premammillary nucleus; PMv) の神経軸索がGnRHニューロンに投射しており、レプチンがGnRH分泌を直接制御していることが示唆された (Leshan et al., 2009)。魚類では、哺乳類のレプチンを使った *in vitro* 実験で、European seabass脳下垂体に対するLHの放出促進作用 (Peyon et al., 2001) や、ニジマス脳下垂体でのFSHとLHの放出促進作用 (Weil et al., 2003) が報告され、レプチンが生殖内分泌

系を直接制御することが示唆されている。一方、魚類のグレリン遺伝子は、2002年のキンギョ (Unniappan et al., 2002) での報告以後、多くの魚種で同定されており (Taranger et al., 2010 参照)、哺乳類と同様に摂食促進作用のあることがキンギョ (Unniappan et al., 2002) や Nile tilapia (Riley et al., 2005) で示されている。生殖への関与については、キンギョの *in vitro* および *in vivo* 実験で、GH 放出促進作用に加え、LH 放出促進作用のあることが報告された (Unniappan and Peter, 2004)。

レプチンやグレリンの、魚類の生殖にかかわる機能は現時点では不明であるが、個体の成長 (栄養状態) と繁殖はエネルギー配分をめぐってトレードオフの関係にあるので、年齢や餌環境による繁殖能力の違いには、これら栄養状態や摂食の情報因子が深くかかわっていることがうかがわれ、きわめて興味深い研究分野である。最近、魚類でもレプチン遺伝子が同定されてきているので (Kurokawa et al., 2005; Huisling et al., 2006; Kurokawa and Murashita, 2009; Frøiland et al., 2010)、今後の研究の進展が期待される。

6. 実験資源学の展開

魚類の生殖内分泌に関する新しい情報は種々の論文を通して毎日のように発信されている。本稿では、魚類の生殖に関する BPG-axis の現時点における情報を整理し、必要と思われるものを抽出、提供した。たとえば、アクチビン (activin) や IGF-1 (insulin-like growth factor 1) などの成長因子の BPG-axis における作用については割愛した。魚類の生殖を調節する最も主要な内分泌因子は、GnRH (脳)、GTH (脳下垂体) およびステロイドホルモン (生殖腺) の三つで、これらの機能解析、およびこれらの制御因子 (神経ペプチド、神経アミンなど) を中心にこれまで研究が行われてきた。生殖における GnRH とステロイドホルモンの機能についてはまだ未解明の部分があるものの、現在、ほぼ共通の理解がなされてきているが、魚類の GTH の機能、特に FSH に関してはほとんど未解明である。また、魚類の生殖に直接影響を及ぼす二つの主要環境要因である日長と温度情報が、どのように内部生理情報と統合され、BPG-axis 制御へ結びついていくかも未解明のままである。さらに、近年、GnRH を上流で制御していると考えられるキスペプチンや、GTH の放出抑制作用のある GnIH の発見など、全く新しい研究対象が魚類でも取り上げられ始めており、環境応答を含む、魚類生殖の内分泌制御機構の全体を通じた理解はまだ先のことになろう。最初に記したように、生殖機構の先端的基礎研究はモデル種で進展すると考えられるが、対象種の特異性、独自性を明らかにし、それをどのような形で利用するかが水産学では要求される。われわれはマサバ、マアジ、カタクチイワシなどの飼育実験を通して、小型浮魚類は当初想定していたよりも飼育、管理が比較的容易で、仔稚魚の飼育を含め、再現性のある実験を行

うことができることを知った。マイワシも親魚が常時入手できる状態になれば、飼育は難しくはない (Matsuyama et al., 1991)。これらの親魚、仔稚魚の飼育実験系は、魚種ごとの、外的および内的要因が親魚の BPG-axis を介した繁殖特性に及ぼす影響を精密に解析できる場を提供するのみならず、繁殖特性と仔稚魚の生残過程との関連を検証するための新たな研究分野を提供する。生理学、生化学、分子生物学を基盤とする仮説と実証に基づいた、小型浮魚類を対象とした実験資源学を展開することにより、水産資源研究に新たな光を与えることができよう。

謝辞

本稿におけるマサバ関連の研究は、科学研究費補助金 (基盤研究 B)、水産総合研究センター交付金プロジェクト研究「水産重要魚種における飼育実験系の確立と環境影響メカニズムの解析」および農林水産省委託プロジェクト研究「環境変動に伴う海洋生物大発生への予測・制御技術の開発」により実施した。

引用文献

- 会田勝美 (1989) 成熟・産卵の内分泌支配。「水族繁殖学」隆島史夫・羽生 功編、緑書房、東京、65-102。
- Aizen, J., H. Kasuto and B. Levavi-Sivan (2007) Development of specific enzyme-linked immunosorbent assay for determining LH and FSH levels in tilapia, using recombinant gonadotropins. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **153**, 323-332.
- Aizen, J., I. Meiri, I. Tzchori, B. Levavi-Sivan and H. Rosenfeld (2005) Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **142**, 212-221.
- Amano, M., M. Iigo, K. Ikuta, S. Kitamura, K. Okuzawa, H. Yamada and K. Yamamori (2004) Disturbance of plasma melatonin profile by high dose melatonin administration inhibits testicular maturation of precocious male masu salmon. *Zool. Sci.*, **21**, 79-85.
- Amano, M., S. Moriyama, M. Iigo, S. Kitamura, N. Amiya, K. Yamamori, K. Ukena and K. Tsutsui (2006) Novel fish hypothalamic neuropeptides stimulate the release of gonadotrophins and growth hormone from the pituitary of sockeye salmon. *J. Endocrinol.*, **188**, 417-423.
- Amano, M., Y. Oka, K. Aida, N. Okumoto, S. Kawashima and Y. Hasegawa (1991) Immunocytochemical demonstration of salmon GnRH and chicken GnRH-II in the brain of masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *J. Comp. Neurol.*, **314**, 587-597.
- Amoss, M., R. Burgus, R. Blackwell, W. Vale, R. Fellows and R. Guillemin (1971) Purification, amino acid composition and N-terminus of the hypothalamic luteinizing hormone releasing factor (LRF) of ovine origin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **44**, 205-210.
- Bayarri, M. J., L. Rodríguez, S. Zanuy, J. A. Madrid, F. J. Sánchez-Vázquez, H. Kagawa, K. Okuzawa and M. Carrillo (2004) Effect of photoperiod manipulation on the daily rhythms of melatonin and reproductive hormones in caged European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **136**, 72-81.
- Biran, J., S. Ben-Dor and B. Levavi-Sivan (2008) Molecular identification and functional characterization of the kisspeptin/kisspeptin receptor system in lower vertebrates. *Biol. Reprod.*, **79**, 776-786.
- Bogerd, J., T. Zanderbergen, E. Andersson and H. Goss, (1994) Isolation, characterization and expression of cDNAs encoding the catfish-type and chicken-II-type gonadotropin-releasing hormone precursors in

- the African catfish. *Eur. J. Biochem.*, **222**, 541–549.
- Cahill, G. M. (2002) Clock mechanisms in zebrafish. *Cell Tissue Res.*, **39**, 27–34.
- Carolsfeld, J., J. F. F. Powell, M. Park, W. H. Fischer, A. G. Craig, J. P. Chang, J. E. Rivier and N. M. Sherwood (2000) Primary structure and function of three gonadotropin-releasing hormones, including a novel form, from an ancient teleost, herring. *Endocrinol.*, **141**, 505–512.
- Cerda-Reverter, J. M., L. A. Sorbera, M. Carrillo and S. Zanuy (1999) Energetic dependence of NPY-induced LH secretion in a teleost fish (*Dicentrarchus labrax*). *Am. J. Physiol.*, **277**, R1627–R1634.
- Chang, J. P., K. L. Yu, A. O. Wong and R. E. Peter (1990) Differential actions of dopamine receptor subtypes on gonadotropin and growth hormone release *in vitro* in goldfish. *Neuroendocrinol.*, **51**, 664–674.
- Colledge, W. H. (2004) GPR54 and puberty (Review). *Trends Endocrinol. Metab.*, **15**, 448–453.
- Copeland, P. A. and P. Thomas (1989) Control of gonadotropin release in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*): evidence for lack of dopaminergic inhibition. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **74**, 474–483.
- De Leeuw, R., C. Van't Veer, H. J. Goos and P. G. Van Oordt (1988) The dopaminergic regulation of gonadotropin-releasing hormone receptor binding in the pituitary of the African catfish, *Clarias gariepinus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **72**, 408–415.
- Dufour, S., E. Lopez, F. Le Menn, N. Le Belle, S. Baloché and Y. A. Fontaine (1988) Stimulation of gonadotropin release and of ovarian development, by the administration of a gonadoliberin agonist and of dopamine antagonists, in female silver eel pretreated with estradiol. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **70**, 20–30.
- Ekström, P. and J. Vanecek (1992) Localization of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in the brain of the Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *Neuroendocrinol.*, **55**, 529–537.
- Falcón, J., L. Besseau, D. Fazzari, J. Attia, P. Gaildrat, M. Beauchaud and G. Boeuf (2003) Melatonin modulates secretion of growth hormone and prolactin by trout pituitary glands and cells in culture. *Endocrinol.*, **144**, 4648–4658.
- Falcón, J., L. Besseau, S. Sauzet and G. Boeuf (2007) Melatonin effects on the hypothalamo-pituitary axis in fish. *Trends Endocrinol. Metab.*, **18**, 81–88.
- Falcón, J., H. Migaud, J. A. Muñoz-Cueto and M. Carrillo (2010) Current knowledge on the melatonin system in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **165**, 469–482.
- Felip, A., S. Zanuy, R. Pineda, L. Pinilla, M. Carrillo, M. Tena-Sempere and A. Gómez (2009) Evidence for two distinct *Kiss* genes in non-placental vertebrates that encode kisspeptins with different gonadotropin-releasing activities in fish and mammals. *Mol. Cell. Endocrinol.*, **312**, 61–71.
- Fernald, R. D. and R. B. White (1999) Gonadotropin-releasing hormone genes: phylogeny, structure, and functions. *Front. Neuroendocrinol.*, **20**, 224–240.
- Frøiland, E., K. Murashita, E. H. Jørgensen and T. Kurokawa (2010) Leptin and ghrelin in anadromous Arctic charr: Cloning and change in expressions during a seasonal feeding cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **165**, 136–143.
- 古川 清・會田勝美・吉岡 基・佐藤英雄・羽生 功 (1991) シロギスの産卵リズムに及ぼす光周期と水温の影響. *日本水産学会誌*, **57**, 2193–2201.
- Gaildrat, P. and J. Falcón (1999) Expression of melatonin receptors and 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding sites in the pituitary of a teleost fish. *Adv. Exp. Biol. Med.*, **460**, 61–72.
- Gaildrat, P. and J. Falcón (2000) Melatonin receptors in the pituitary of a teleost fish: mRNA expression, 2-[¹²⁵I]iodomelatonin binding and cyclic AMP response. *Neuroendocrinol.*, **72**, 57–66.
- García-Hernández M. P., Y. Koide, M. V. Díaz and H. Kawachi (1997) Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from the pituitary gland of Mediterranean yellowtail, *Seriola dumerilii* (Risso, 1810). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **106**, 389–399.
- González-Martínez, D., T. Madigou, N. Zmora, I. Anglade, S. Zanuy, Y. Zohar, A. Elizur, J. A. Muñoz-Cueto and O. Kah (2001). Differential expression of three different prepro-GnRH (gonadotrophin-releasing hormone) messengers in the brain of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *J. Comp. Neurol.*, **429**, 144–155.
- Huising, M. O., E. J. Geven, C. P. Kruiswijk, S. B. Nabuurs, E. H. Stolte, F. A. Spanings, B. M. Verburg-van Kemenade and G. Flik (2006) Increased leptin expression in common carp (*Cyprinus carpio*) after food intake but not after fasting or feeding to satiation. *Endocrinol.*, **147**, 5786–5797.
- Kagawa, H., K. Gen, K. Okuzawa and H. Tanaka (2003) Effects of luteinizing hormone and follicle stimulating hormone and insulin-like growth factor-I on aromatase activity and P450 aromatase gene expression in the ovarian follicle of red seabream, *Pagrus major*. *Biol. Reprod.*, **68**, 1562–1568.
- Kagawa, H., H. Tanaka, K. Okuzawa and M. Kobayashi (1998) GTH II but not GTH I induces final maturation and the development of maturational competence of oocytes of red seabream *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **112**, 80–88.
- Kah, O., J. M. Danger, P. Dubourg, G. Pelletier, H. Vaudry and A. Calas (1989) Characterization, cerebral distribution and gonadotrophin-release activity of neuropeptide Y (NPY) in the goldfish. *Fish Physiol. Biochem.*, **7**, 69–76.
- Kah, O., C. Lethimonier, G. Somoza, L. G. Guilgur, C. Vaillant and J. J. Lareyre (2007) GnRH and GnRH receptors in metazoa: A historical, comparative, and evolutive perspective. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **153**, 346–364.
- Kanda, S., Y. Akazome, T. Matsunaga, N. Yamamoto, S. Yamada, H. Tsukamura, K. Maeda and Y. Oka (2008) Identification of *Kiss-1* product kisspeptin and steroid-sensitive sexually dimorphic kisspeptin neurons in medaka (*Oryzias latipes*). *Endocrinol.*, **149**, 2467–2476.
- 金子賢介・北野 載・清水昭男・米田道夫・松藤由佳・S. Selvaraj・藤永陽一郎・山口明彦・松山倫也 (2009) マサバの精製GtHによる各種卵濾胞の*in vitro*ステロイド産生能. 平成21年度日本水産学会春季大会, 講演要旨, 305.
- Khan, I. A. and P. Thomas (1996) Melatonin influences gonadotropin II secretion in the Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **104**, 231–242.
- Kim, M. K., Y. Oka, M. Amano, M. Kobayashi, K. Okuzawa, Y. Hasegawa, S. Kawashima, Y. Suzuki and K. Aida (1995) Immunocytochemical localization of sGnRH and cGnRH-II in the brain of goldfish, *Carassius auratus*. *J. Comp. Neurol.*, **356**, 72–82.
- King, J. A., S. Dufour, Y.-A. Fontaine and R. P. Millar (1990) Chromatographic and immunological evidence for mammalian GnRH and chicken GnRH-II in eel (*Anguilla anguilla*) brain and pituitary. *Pep-tides*, **11**, 507–514.
- King, W. V., P. Thomas, R. M. Harrell, R. G. Hodson and C. V. Sullivan (1994) Plasma levels of gonadal steroids during final oocyte maturation of striped bass, *Morone saxatilis* L. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **95**, 178–191.
- Kitahashi, T., S. Ogawa and I. S. Parhar (2009) Cloning and expression of *kiss2* in the zebrafish and medaka. *Endocrinol.*, **150**, 821–831.
- Kitano, H., S. Irie, K. Ohta, A. Yamaguchi and M. Matsuyama (2008) Regulation of asynchronous development of ovarian follicles by the expression levels of two gonadotropin receptors in a daily spawning teleost, a bambooleaf wrasse, *Pseudolabrus sieboldi*. *Proc. 5th World Fisheries Congress*, 3a–11.
- 小林牧人 (2002) 魚類の性行動の内分調節と性的可逆性—魚類

- の脳は両性か一。「魚類のニューロサイエンス」, 植松一眞・岡 良隆・伊藤博信編, 恒星社厚生閣, 東京, 245-262.
- 小林牧人・足立伸次 (2002) 生殖。「魚類生理学の基礎」, 会田勝美編, 恒星社厚生閣, 東京, 155-184.
- Koide, Y., H. Itoh and H. Kawauchi (1993) Isolation and characterization of two distinct gonadotropins, GTH I and GTH II, from bonito (*Katsuwonus pelamis*) pituitary glands. *Int. J. Pept. Protein Res.*, **41**, 52-65.
- Kojima, M., H. Hosoda, Y. Date, M. Nakazato, H. Matsuo and K. Kangawa (1999) Ghrelin is a growth-hormone-releasing acylated peptide from stomach. *Nature*, **402**, 656-660.
- Kriegsfeld, L. J., D. F. Mei, G. E. Bentley, T. Ubuka, A. O. Mason, K. Inoue, K. Ukena, K. Tsutsui and R. Silver (2006) Identification and characterization of a gonadotropin-inhibitory system in the brains of mammals. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **103**, 2410-2415.
- Kulczykowska, E., H. Kalamarz, J. M. Warne and R. J. Balment (2006) Day-night specific binding of 2-[¹²⁵I]iodomelatonin and melatonin content in gill, small intestine and kidney of three fish species. *J. Comp. Physiol.*, **B176**, 277-285.
- 栗田 豊 (2010) 産卵親魚個体群の繁殖特性の変化が加入量に及ぼす影響. *水産海洋研究*, **74** (特集号), 4-18.
- Kurokawa, T. and K. Murashita (2009) Genomic characterization of multiple leptin genes and a leptin receptor gene in the Japanese medaka, *Oryzias latipes*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **161**, 229-237.
- Kurokawa, T., S. Uji and T. Suzuki (2005) Identification of cDNA coding for a homologue to mammalian leptin from pufferfish, *Takifugu rubripes*. *Peptides*, **26**, 745-750.
- Leshan, R. L., G. W. Louis, Y. H. Jo, C. J. Rhodes, H. Münzberg and M. G. Myers Jr (2009) Direct innervation of GnRH neurons by metabolic- and sexual odorant-sensing leptin receptor neurons in the hypothalamic ventral premammillary nucleus. *J. Neurosci.*, **29**, 3138-3147.
- Levavi-Sivan, B., J. Biran and E. Fireman (2006) Sex steroids are involved in the regulation of gonadotropin-releasing hormone and dopamine D2 receptors in female tilapia pituitary. *Biol. Reprod.*, **75**, 642-650.
- Li, S., Y. Zhang, Y. Liu, X. Huang, W. Huang, D. Lu, P. Zhu, Y. Shi, C. Cheng, X. Liu and H. Lin (2009) Structural and functional multiplicity of the kisspeptin/GPR54 system in goldfish (*Carassius auratus*). *J. Endocrinol.*, **201**, 407-418.
- Lubzens, E., G. Young, J. Bobe and J. Cerdà (2010) Oogenesis in teleosts: How fish eggs are formed. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **165**, 367-389.
- Manaños, E. L., I. Anglade, J. Chyb, C. Saligaut, B. Breton and O. Kah (1999) Involvement of gamma-aminobutyric acid in the control of GTH-1 and GTH-2 secretion in male and female rainbow trout. *Neuroendocrinol.*, **69**, 269-280.
- 松藤由佳・入路光雄・金子賢介・北野 載・山口明彦・望岡典隆・松山倫也 (2009) ミトコンドリア DNA を用いた母子判定に基づくマサバの産卵頻度. *日本水産増殖学会第8回大会講演要旨*, 23.
- Matsuo, H., Y. Baba, R. M. Nair, A. Arimura and A. V. Schally (1971) Structure of the porcine LH- and FSH-releasing hormone. I. The proposed amino acid sequence. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **43**, 1334-1339.
- Matsuyama, M. (2007) Follicular steroidogenesis in fish. In: *Fish Reproduction*, eds. M.J. Rocha, A. Arukwe and B. G. Kapoor, Science Publisher, NH, 171-199.
- Matsuyama, M., S. Adachi, Y. Nagahama, C. Kitajima and S. Matsuura (1991) Annual reproductive cycle of the captive female Japanese sardine *Sardinops melanostictus*: relationship to ovarian development and serum levels of gonadal steroid hormones. *Mar. Biol.*, **108**, 21-29.
- 松山倫也・小林牧人・足立伸次 (2000) 「魚類の配偶子形成機構—水産における基礎と応用—」. *月刊海洋*, **32**, 東京, 131 pp.
- Matsuyama, M., S. Morita, T. Nasu and M. Kashiwagi (1998) Daily spawning and development of sensitivity to gonadotropin and maturation-inducing steroid in the oocytes of the bambooleaf wrasse *Pseudolabrus japonicus*. *Env. Biol. Fish.*, **52**, 281-290.
- Matauyama, M., A. Sasaki, K. Nakagawa, T. Kobayashi, Y. Nagahama and H. Chuda (2001) Maturation-inducing hormone of the tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Tetraodontidae, Teleostei): Biosynthesis of steroids by the ovaries and the relative effectiveness of steroid metabolites for germinal vesicle breakdown *in vitro*. *Zool. Sci.*, **18**, 225-234.
- 松山倫也・白石哲朗・入路光雄・金子賢介・山口明彦 (2007) マサバの産卵頻度について. *2007年度水産海洋学会研究発表大会講演要旨*, 54.
- Matsuyama, M., T. Shiraiishi, J.K. Sundaray, Md. A. Rahman, K. Ohta and A. Yamaguchi (2005) Steroidogenesis in ovarian follicles of chub mackerel, *Scomber japonicus*. *Zool. Sci.*, **22**, 101-110.
- Mazurais, D., I. Brierley, I. Anglade, J. Drew, C. Randall, N. Bromage, D. Michel, O. Kah and L. M. Williams (1999) Central melatonin receptors in the rainbow trout: Comparative distribution of ligand binding and gene expression. *J. Comp. Neurol.*, **409**, 313-324.
- Meseguer, C., J. Ramos, M. J. Bayarri, C. Oliveira and F. J. Sánchez-Vázquez (2008) Light synchronization of the daily spawning rhythms of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) kept under different photoperiod and after shifting the LD cycle. *Chronobiol. Int.*, **25**, 666-679.
- Misztal, T., K. Romanowicz and B. Barcikowski (2002) Effect of melatonin on daily LH secretion in intact and ovariectomized ewes during the breeding season. *Anim. Reprod. Sci.*, **69**, 187-198.
- Munakata, A. and M. Kobayashi (2010) Endocrine control of sexual behavior in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **165**, 456-468.
- Ohta, K., T. Mine, A. Yamaguchi and M. Matsuyama (2008) Sexually dimorphic expression of pituitary glycoprotein hormones in a sex-change fish (*Pseudolabrus sieboldi*). *J. Exp. Zool.*, **309A**, 534-541.
- Ohtaki, T., Y. Shintani, S. Honda, H. Matsumoto, A. Hori, K. Kanehashi, Y. Terao, S. Kumano, Y. Takatsu, Y. Masuda, Y. Ishibashi, T. Watanabe, M. Asada, T. Yamada, M. Suenaga, C. Kitada, S. Usuki, T. Kurokawa, H. Onda, O. Nishimura and M. Fujino (2001) Metastasis suppressor gene KiSS-1 encodes peptide ligand of a G-protein-coupled receptor. *Nature*, **411**, 613-617.
- Okada, T., I. Kawazoe, S. Kimura, Y. Sasamoto, K. Aida and H. Kawauchi (1994) Purification and characterization of gonadotropin I and II from pituitary glands of tuna (*Thunnus obesus*). *Int. J. Pept. Protein Res.*, **43**, 69-80.
- 大久保範聡 (2007) ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) 作用系の比較生物学. *比較内分泌学会ニュース*, **126**, 2-12.
- Okubo, K., M. Amano, Y. Yoshiura, H. Suetake and K. Aida (2000) A novel form of gonadotropin-releasing hormone in the medaka, *Oryzias latipes*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **16**, 298-303.
- Okuzawa, K., K. Furukawa, K. Aida and I. Hanyu (1994) The effects of water temperature on gonadotropin-releasing hormone contents in the discrete brain areas and pituitary of male honmoroko *Gnathopogon caeruleus*. *Fish. Sci.*, **60**, 155-158.
- Okuzawa, K., J. Granneman, J. Bogerd, H. J. Th. Goos, Y. Zohar and H. Kagawa (1997) Distinct expression of GnRH genes in the red seabream brain. *Fish Physiol. Biochem.*, **17**, 71-79.
- Okuzawa, K., N. Kumakura, K. Gen, S. Yamaguchi, B. S. Lim and H. Kagawa (2003) Effect of high water temperature on brain-pituitary-gonad axis of the red seabream during its spawning season. *Fish Physiol. Biochem.*, **28**, 439-440.
- Peng, C., W. Gallin, R. E. Peter, A. G. Blomqvist and D. Larhammar (1994) Neuropeptide-Y gene expression in the goldfish brain: distribution and regulation by ovarian steroids. *Endocrinol.*, **134**,

- 1095–1103.
- Peng, O., S. Humphries, R. E. Peter, J. E. Rivier, A. G. Blomqvist and D. Larhammar (1993) Actions of goldfish neuropeptide Y on the secretion of growth hormone and gonadotropin-II in female goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **90**, 306–317.
- Peter, R. E., H. R. Lin and G. Van Der Kraak (1988) Induced ovulation and spawning of culture freshwater fish in China: advances in application of GnRH analogues and dopamine antagonists. *Aquaculture*, **74**, 1–10.
- Peyon, P., S. Zanuy and M. Carrillo (2001) Action of leptin on *in vitro* luteinizing hormone release in the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Biol. Reprod.*, **65**, 1573–1578.
- Planas, J. V. and P. Swanson (2007) Physiological function of gonadotropins in fish. In: *Fish Reproduction*, eds. M. J. Rocha, A. Arukwe and B. G. Kapoor, Science Publishes, NH, 37–66.
- Powell, J. F. F., S. L. Krueckl, P. M. Collins and N. M. Sherwood (1996) Molecular forms of GnRH in three model fishes: Rockfish, medaka and zebrafish. *J. Endocrinol.*, **150**, 17–23.
- Powell, J. F. F., Y. Zohar, A. Elizur, M. Park, W. H. Fischer, A. G. Craig, J. E. Rivier, D. A. Lovejoy and N. M. Sherwood (1994) Three forms of gonadotropin-releasing hormone characterized from brains of one species. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **91**, 12081–12085.
- Riley, L. G., K. B. K. Fox, H. Kaiya, T. Hirano and E. G. Grau (2005) Long-term treatment of ghrelin stimulates feeding, fat deposition, and alters the GH/IGF-I axis in the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **142**, 234–240.
- Sauzet, S., L. Besseau, P. Herrera Perez, D. Covès, B. Chatain, E. Peyric, G. Boeuf, J. A. Muñoz-Cueto and J. Falcón (2008) Cloning and retinal expression of melatonin receptors in the European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **157**, 186–195.
- Sawada, K., K. Ukena, H. Satake, E. Iwakoshi, H. Minakata and K. Tsutsui (2002) Novel fish hypothalamic neuropeptide: cloning of a cDNA encoding the precursor polypeptide and identification and localisation of the mature peptide. *Euro. J. Biochem.*, **269**, 6000–6008.
- Selvaraj, S., H. Kitano, Y. Fujinaga, M. Amano, A. Takahashi, A. Shimizu, M. Yoneda, A. Yamaguchi and M. Matsuyama (2009) Immunological characterization and distribution of three GnRH forms in the brain and pituitary gland of chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Zool. Sci.*, **26**, 827–839.
- Selvaraj, S., 北野 載・山口明彦・米田道夫・清水昭男・松山倫也 (2010) マサバの KiSS 遺伝子のクローニングおよび生殖周期における mRNA の発現量変化。平成 22 年度日本水産学会春季大会，講演要旨，311。
- Sherwood, N. M. and B. A. Adams (2007) Gonadotropin-releasing hormone in fish: evolution, expression and regulation of the GnRH gene. In: *Hormones and their receptors in fish reproduction*, eds P. Melamed and N. M. Sherwood, World Scientific, NJ, 1–39.
- Sherwood, N. M., L. Eiden, M. Brownstein, J. Spiess, J. Rivier and W. Vale (1983) Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **80**, 2794–2798.
- Sherwood, N. M., B. Harvey, M. J. B. Rownstein and L. E. Eiden, (1984). Gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH) in striped mullet (*Mugil cephalus*), milkfish (*Chanos chanos*), and rainbow trout (*Salmo gairdneri*): Comparison with salmon GnRH. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **55**, 74–181.
- 清水昭男 (2010) 環境条件による魚類生殖周期の制御機構。水産海洋研究，**74** (特集号)，58–65。
- Shimizu, A. and M. Yamashita (2002) Purification of mummichog (*Fundulus heteroclitus*) gonadotropins and their subunits, using an immunochemical assay with antisera raised against synthetic peptides. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **125**, 79–91.
- Shiraishi, T., S. D. Ketkar, Y. Katoh, M. Nyuji, A. Yamaguchi and M. Matsuyama (2009) Spawning frequency of the Tsushima Current subpopulation of chub mackerel *Scomber japonicus* off Kyushu, Japan. *Fish. Sci.*, **75**, 649–655.
- Shiraishi, T., S. D. Ketkar, H. Kitano, M. Nyuji, A. Yamaguchi and M. Matsuyama (2008) Time course of final oocyte maturation and ovulation in chub mackerel *Scomber japonicus* induced by hCG and GnRHa. *Fish. Sci.*, **74**, 764–769.
- Shiraishi, T., K. Ohta, A. Yamaguchi, M. Yoda, H. Chuda and M. Matsuyama (2005) Reproductive parameters of the chub mackerel *Scomber japonicus* estimated from human chorionic gonadotropin-induced final oocyte maturation and ovulation in captivity. *Fish. Sci.*, **71**, 531–542.
- Silverstein, J. T., J. Breining, D. G. Baskin and E. M. Plisetskaya (1998) Neuropeptide Y-like gene expression in the salmon brain increases with fasting. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **110**, 157–165.
- Sloley, B. D., O. Kah, V. L. Trudeau, J. G. Dulka and R. E. Peter (1992) Amino acid neurotransmitters and dopamine in brain and pituitary of the goldfish: involvement in the regulation of gonadotropin secretion. *J. Neurochem.*, **58**, 2254–2262.
- Smith, J. T. (2008) Kisspeptin signaling in the brain: steroid regulation in the rodent and ewe. *Brain Res. Rev.*, **57**, 288–298.
- Smith, J. T., B. V. Acohido, D. K. Clifton and R. A. Steiner (2006) KiSS-1 neurones are direct targets for leptin in the ob/ob mouse. *J. Neuroendocrinol.*, **18**, 298–303.
- Stacey, N. E., A. F. Cook and R. E. Peter (1979) Spontaneous and gonadotropin-induced ovulation in the goldfish, *Carassius auratus* L.: effects of external factors. *J. Fish Biol.*, **15**, 349–361.
- Stacey, N. E. and P. W. Sorensen (2007) Hormonally derived sex pheromones in fish. In: *Fish Reproduction*, eds. M. J. Rocha, A. Arukwe and B. G. Kapoor, Science Publisher, NH, 201–244.
- Suzuki, K., H. Kawachi and Y. Nagahama (1988) Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **71**, 292–301.
- Tanaka, H., H. Kagawa, K. Okuzawa and K. Hirose (1993) Purification of gonadotropins (pmGTH-I and pmGTH-II) from red seabream (*Paragrass major*) and development of a homologous radioimmunoassay for pmGth-II. *Fish Physiol. Biochem.*, **10**, 409–418.
- Taranger, G. L., M. Carrillo, R. W. Schulz, P. Fontaine, S. Zanuy, A. Felip, F. A. Weltzien, S. Dufour, Ø. Karlsen, B. Norberg, E. Andersson and T. Hansen (2010) Control of puberty in farmed fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **165**, 483–515.
- Trudeau, V. L. (1997) Neuroendocrine regulation of gonadotrophin II release and gonadal growth in the goldfish, *Carassius auratus*. *Rev. Reprod.*, **2**, 55–68.
- Trudeau, V. L., D. Spanswick, E. J. Fraser, K. Lariviere, D. Crump, S. Chiu, M. MacMillan and R. W. Schulz (2000) The role of amino acid neurotransmitters in the regulation of pituitary gonadotropin release in fish. *Biochem. Cell Biol.*, **78**, 241–259.
- Tsutsui, K., E. Saigoh, K. Ukena, H. Teranishi, Y. Fujisawa, M. Kikuchi, S. Ishii and P. J. Sharp (2000) A novel avian hypothalamic peptide inhibiting gonadotropin release. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **275**, 661–667.
- Tyler, C., J. Sumpter, H. Kawachi and P. Swanson (1991) Involvement of gonadotropins I and II in the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **84**, 291–299.
- Ubuka, T., G. E. Bentley, K. Ukena, J. C. Wingfield and K. Tsutsui (2005) Melatonin induces the expression of gonadotropin-inhibitory hormone in the avian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, **102**, 3052–3057.
- Unniappan, S., X. Lin, L. Cervini, J. Rivier, H. Kaiya, K. Kangawa and R. E. Peter (2002) Goldfish ghrelin: Molecular characterization of the

- complementary deoxyribonucleic acid, partial gene structure and evidence for its stimulatory role in food intake. *Endocrinol.*, **143**, 4143–4146.
- Unniappan, S. and R. E. Peter (2004) *In vitro* and *in vivo* effects of ghrelin on luteinizing hormone and growth hormone release in goldfish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **286**, R1093–R1101.
- Vacher, C., E. L. Mananos, B. Breton, M. H. Marmignon and C. Saligaut (2000) Modulation of pituitary dopamine D1 or D2 receptors and secretion of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone during the annual reproductive cycle of female rainbow trout. *J. Neuroendocrinol.*, **12**, 1219–1226.
- Van Der Kraak, G., K. Suzuki, R. E. Peter, H. Itoh and H. Kawauchi (1992) Properties of common carp gonadotropin I and II. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **85**, 217–229.
- Vidal, B., C. Pasqualiny, N. L. Belle, M. C. Holland, P. Vernier, Y. Zohar and S. Dufour (2004) Dopamine inhibits luteinizing hormone synthesis and release in the juvenile European eel: a neuroendocrine link for the onset of puberty. *Biol. Reprod.*, **71**, 1491–1500.
- Weil, C., P. Y. Le Bail, N. Sabin and F. Le Gac. (2003) *In vitro* action of leptin on FSH and LH production in rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*) at different stages of the sexual cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **130**, 2–12.
- Weltzien, F. A., B. Norberg and P. Swanson (2003) Isolation and characterization of FSH and LH from pituitary glands of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). *Gen. Comp. Endocrinol.*, **131**, 97–105.
- White, S. A., T. L. Kasten, C. T. Bond, J. P. Adelman and R. D. Fernald (1995) Three gonadotropin-releasing hormone genes in one organism suggest novel roles for an ancient peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **92**, 8363–8367.
- Yaron, Z. (1995) Endocrine control of gametogenesis and spawning induction in the carp. *Aquaculture*, **129**, 49–73.
- Yin, H., K. Ukena, T. Ubuka and K. Tsutsui (2005) A novel G protein-coupled receptor for gonadotropin-inhibitory hormone in the Japanese quail (*Coturnix japonica*): identification, expression and binding activity. *J. Endocrinol.*, **184**, 257–266.
- 米田道夫 (2010) 繁殖特性の変異が加入量に及ぼす影響—大西洋のマダラ類 (*Gadus morhua*) を例に. *水産海洋研究*, **74** (特集号), 19–26.
- Yu, K. L., P. M. Rosenblum and R. E. Peter (1991) *In vitro* release of gonadotropin-releasing hormone from the brain preoptic-anterior hypothalamic region and pituitary of female goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **81**, 256–267.
- Yu, K. L., N. M. Sherwood and R. E. Peter (1988) Differential distribution of two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in discrete brain areas of goldfish (*Carassius auratus*). *Peptides*, **9**, 625–630.
- Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman (1994) Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature*, **372**, 425–432.
- Zhu, Y., K. Furukawa and K. Aida (1991) Effects of photoperiod on spawning rhythm in the tobinnumeri-dragonet *Reponucenus beniteguri*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **57**, 2033–2037.
- Zohar, Y., J. A. Muñoz-Cueto, A. Elizur and O. Kah (2010) Neuroendocrinology of reproduction in teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, **165**, 438–455.