

学 位 論 文 題 名

Biochemical and molecular biological studies on the
olfactory system of several salmonid species.

(サケ科魚類嗅神経系の生化学的・分子生物学的研究)

学位論文内容の要旨

降海性サケ科魚類は、稚魚期に河川に放流されるとその川を記憶(母川記銘)して降海し、海洋を数年間回遊した後、産卵のため放流された川に回帰(母川回帰)することから、我が国水産増殖上の有用対象魚の一つになっている。特にシロサケ(*Oncorhynchus keta*)の人工孵化放流事業は産業的に成功をおさめている。近年、より付加価値の高いベニザケ(*O. nerka*)およびサクラマス(*O. masou*)の放流事業が試験的に試みられているが、これらの種は1年以上の淡水生活をへた後に降海することから、効率のよい放流法の確立が望まれており、サケ科魚類の母川記銘と母川回帰機構の解明が重要な課題になっている。

サケの母川回帰時の母川水識別には母川水の「匂い」が関与し、それを感知する嗅神経系(嗅上皮、嗅神経および嗅球)が重要な役割を果たしていることが行動学的および電気生理学的研究により示唆されてきた。しかし、嗅神経系が実際にどのような機序で母川記銘と母川識別に関与しているかは殆ど解明されておらず、特に、分子レベルで嗅神経系の生化学的および分子生物学的解明を試みた研究は殆どない。

本研究では、将来の放流技術へ応用可能な嗅神経系内の分子の検索のための基礎的知見を得ることを目的とし、3種のサケ科魚類(*O. keta*, *O. nerka*, *O. masou*)を用い、嗅神経系に特異的に存在する甲状腺ホルモンレセプター(THR)、サケ型生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(sGnRH)およびサケ科魚類嗅神経組織特異蛋白

(N24) の 3 種類の分子に注目し、それらの母川記銘と母川回帰に伴う変化を形態学的手法に基づいて生化学的および分子生物学的に解析した。

サケ科魚類の降海行動時前すなわち銀化変態時には、血中甲状腺ホルモン (T_4) が増加し、降海直前には著増することが知られている。これらの変化は、海水適応能の獲得や体表の銀白化、降海行動および母川記銘などに関与することが示唆されているがその詳細は不明である。血中 T_4 は標的細胞に到達すると活性型の甲状腺ホルモン (T_3) に転換され核内レセプターに結合することにより作用することから、銀化変態に伴う天然サクラマス¹の嗅神経組織と脳における THR の局在性と結合能を新たに開発した放射標識 T_3 を用いた組織切片上でのラジオレセプターアッセイ法により調べた。その結果、各組織の切片上で T_3 の特異的結合がみられ、高親和性 ($K_d=3.86 \times 10^{-10}$) で一種類の結合部位を持つ THR の存在が確認された。さらに、嗅上皮は嗅球を含む脳の他の部位より T_3 結合性が高いこと、および銀化変態に伴い降海直前のフルスモルト²個体の嗅上皮で T_3 結合量が急増していることが明らかとなった。これらのことから、降海時のサクラマス嗅上皮で THR が嗅覚機能に関連した重要な役割を演じている可能性が示された。

sGnRH は視床下部以外に嗅覚の一次中枢である嗅球にも局在すること、また sGnRH 産生細胞が発生的に嗅上皮原基由来であることから、嗅覚機能に関与していることが示唆されている。そこで 2 種のサケ科魚類の嗅神経系における sGnRH の局在と動態を機能形態学的に調べた。その結果、サクラマスの嗅上皮と嗅球の軸索に高電子密度の sGnRH 含有顆粒状構造物が存在することを免疫電顕法により観察し、sGnRH が実際に嗅上皮にも軸索を介して輸送されていること、および嗅神経背面部に新たな sGnRH 産生神経細胞が存在することをはじめて明らかにした。産卵回遊に伴うシロサケの sGnRH 産生神経細胞の変化を免疫細胞学的手法と *in situ* ハイブリダイゼーション法により調べた結果、嗅神経背面部の sGnRH 産生神経細胞は母川接岸時まで sGnRH 前駆体 mRNA の発現と sGnRH の産生が認められるが、母川遡上後には両方法とも検出不能となり sGnRH 産生が停止していることが示され、sGnRH が母川回帰時の嗅覚機能に神経修飾物質として関与して

いる可能性が示唆された。一方、視索前野および終脳の sGnRH 産生神経細胞は母川遡上後に発現が高まり、従来から指摘されている sGnRH の機能である脳下垂体からの生殖腺刺激ホルモン放出に関与している可能性が示唆され、生殖腺の最終成熟に作用していると推察された。しかし、嗅覚機能と性成熟機能に各々関与する sGnRH の物質的異同は明らかにされなかった。

電気泳動法によりヒメマス嗅神経組織から見つけられた N24 に対する抗血清は、他のサケ科魚類とも免疫交差性を有し、母川記銘と母川回帰時に免疫性が増加することが明らかにされている。そこで N24 のより詳細な局在性を免疫細胞化学的に調べた結果、N24 は嗅上皮の嗅細胞の核周辺部と頂上部側の細胞質および嗅細胞基底部側から伸長する軸索に存在することが、嗅球では嗅神経が入り込む糸球体層までの軸索に存在することが明らかになった。ヒメマス初期発生に伴う解析では、嗅上皮原基中で嗅細胞の形態形成が確認された時期以降に N24 が出現し、その後増加することが明らかにされた。シロサケ母川回帰に伴う N24 の免疫細胞学的反応性は、北洋での索餌回遊中に強く、産卵回遊および母川識別時には雌雄差が存在する可能性が示唆された。さらに嗅上皮摘除実験により N24 の産生部位が嗅細胞であること、摘除後嗅球内の N24 免疫性の消失時間より N24 は嗅覚情報の伝達に関与する神経修飾物質として作用している可能性が示唆された。次に、嗅神経組織における N24 の性状を生化学的に調べた結果、N24 はサイトゾール画分中に存在し、ゲル濾過法により分子量約 43.3 kDa のホモ二量体であることが明らかになった。N24 の一次構造解析を行うために、まず N24 を抗 N24 抗体を用いた免疫アフィニティークロマトグラフィーと HPLC による逆相クロマトグラフィーにより蛋白精製を行い、その後、リジルエンドペプチターゼ消化によるペプチド断片を得て N24 アミノ酸内部配列と N 末端配列を気相プロテインシーケンサーにより決定した。得られたアミノ酸一次構造の情報を元に作製したプライマーを用いてヒメマス嗅上皮 cDNA を鋳型にした PCR 法により N24 cDNA 断片を得て、N24 の部分塩基配列を決定した。その塩基配列と既知の物質との相同性をデータベースにより検索した結果、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) クラ

ス π という、近年嗅覚との関連が示されている生体内転換（薬物代謝）酵素の一種と高い相同性を有することが示された。さらに、同酵素の性質を利用した GST アフィニティークロマトグラフィーにより精製される蛋白質のうち約 24 kDa の蛋白質と抗 N24 抗血清が免疫交差反応を示すことから、N24 は GST としての酵素活性を持つことが示唆された。また、N24 cDNA 断片をプローブに用いたノーザンブロット解析により、ヒメマス嗅上皮と嗅球における N24 mRNA の発現を調べた結果、嗅上皮のみで約 950 base のバンドとして発現が認められた。これらのことから、N24 は嗅細胞において GST 活性を利用した匂い物質の体外への排出などの生体内転換酵素として嗅覚機能に強く関わる可能性が示された。

以上の結果から、サケ科魚類嗅神経系において THR は特に銀化変態と降海行動時の嗅覚機能に、sGnRH は神経修飾物質として母川回帰時の嗅覚機能に、N24 は生体内転換酵素として嗅覚機能に関与している分子であることが示唆された。しかし、これら 3 分子の詳細な嗅情報伝達機構については今後の課題として残された。また、新たな手法による匂いの記憶などに関わる分子の検索がサケ科魚類の母川記銘と母川回帰機構を解明する上で重要な課題になると考えられた。

学位論文審査の要旨

主査	教授	山内	皓平
副査	教授	麦谷	泰雄
副査	教授	原	彰彦
副査	助教授	上田	宏
副査	講師	足立	伸次

学位論文題名

Biochemical and molecular biological studies on the olfactory system of several salmonid species.

(サケ科魚類嗅神経系の生化学的・分子生物学的研究)

降海性サケ科魚類は、稚魚期に河川に放流されるとその川を記憶(母川記銘)して降海し、海洋を数年間回遊した後、産卵のため放流された川に回帰(母川回帰)することから、我が国水産増殖上の有用対象魚の一つになっている。特にシロサケの人工孵化放流事業は産業的に成功をおさめている。近年、付加価値の高いベニザケおよびサクラマス放流事業が試験的に試みられているが、これらの種は1年以上の淡水生活をへた後に降海することから、効率のよい放流法の確立が望まれており、サケ科魚類の母川記銘と母川回帰機構の解明が重要な課題になっている。

サケの母川回帰時の母川水識別には「匂い」が関与し、それを感知する嗅神経系が重要な役割を果たしていることが行動学および電気生理学的研究により示唆されてきた。しかし、嗅神経系が実際にどのような機序で母川記銘と母川識別に関与しているかは殆ど解明されておらず、特に、分子レベルで嗅神経系の生化学的および分子生物学的解明を試みた研究は殆どない。

本研究では、放流技術へ応用可能な嗅神経系内の分子の検索のための基礎的知見を得ることを目的とし、嗅神経系に特異的に存在する甲状腺ホルモンレセプター(THR)、サケ型生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン(sGnRH)およびサケ科魚類嗅神経組織特異蛋白(N24)の3分子に注目し、それらの母川記銘と母川回帰に伴う変化を生化学的および分子生物学的に解析した。

サケ科魚類の降海行動時前すなわち銀化変態時には、血中甲状腺ホルモン(T_4)が増加し、降海直前には著増することが知られている。血中 T_4 は標的細胞に到達すると活性型の甲状腺ホルモン(T_3)に転換され核内レセプターに結合することにより作用することから、銀化変態に伴う天然サクラマスの嗅神経組織と脳におけるTHRの局在性と結合能を新たに開発した放射標識 T_3 を用いた組織切片上でのラジオレセプターアッセイ法により調べた。その結果、各組織の切片上で T_3 の特異的結合がみられ、高親和性で一種類の結合部位を持つTHRの存在が確認された。

らに、嗅上皮は嗅球を含む脳の他の部位より T_3 結合性が高いこと、および銀化変態に伴い降海直前の個体の嗅上皮で T_3 結合量が急増していることが明らかとなった。これらのことから、降海時のサクラマス嗅上皮で THR が嗅覚機能に関連した重要な役割を演じている可能性が示された。

sGnRH は嗅覚の一次中枢である嗅球にも局在すること、また sGnRH 産生細胞が発生学的に嗅上皮原基由来であることから、嗅覚機能に関与していることが示唆されている。そこでサケ科魚類の嗅神経系における sGnRH の局在と動態を機能形態学的に調べた。その結果、サクラマスにおいて sGnRH が実際に嗅上皮にも軸索を介して輸送されていること、および嗅神経背面部に新たな sGnRH 産生神経細胞が存在することをはじめ明らかにした。産卵回遊に伴うシロサケの sGnRH 産生神経細胞の変化を免疫細胞学的手法と *in situ* ハイブリダイゼーション法により調べた結果、嗅神経背面部の sGnRH 産生神経細胞は母川接岸時まで sGnRH 前駆体 mRNA の発現と sGnRH の産生が認められるが、母川遡上後には両方法とも検出不能となり sGnRH 産生が停止していることが示され、sGnRH が母川回帰時の嗅覚機能に神経修飾物質として関与している可能性が示唆された。

ヒメマス嗅神経組織から見つけられた N24 に対する抗血清は他のサケ科魚類とも免疫交差性を有し、母川記銘と母川回帰時に免疫性が増加することが明らかにされてきた。そこで N24 の詳細な局在性を免疫細胞化学的に調べた結果、N24 は嗅上皮の嗅細胞の細胞質および基底下の軸索に存在することが、嗅球では嗅神経が入り込む糸球体層までに存在することが明らかになった。シロサケ母川回帰に伴う N24 量の変化は、雌雄差が存在することが示唆された。さらに嗅上皮摘除実験により N24 の産生部位が嗅細胞であること、および N24 は嗅覚情報の伝達に関与する神経修飾物質として作用していることが示唆された。次に嗅神経組織における N24 の性状を生化学的に調べた結果、N24 はサイトゾール画分中に存在し、分子量約 43.3 kDa のホモ二量体であることが明らかになった。N24 の一次構造解析を行うために、まず N24 の蛋白精製を行い、その後酵素消化によるペプチド断片を得て N24 アミノ酸配列の一部を決定した。得られた情報を元にヒメマス嗅上皮 cDNA を鋳型にした PCR 法により N24 cDNA 断片を得て、N24 の部分塩基配列を決定した。その塩基配列は既知の物質との相同性から、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) π という、近年嗅覚との関連が示されている生体内転換酵素の一種であることが示された。さらに、同酵素の性質を利用した GST アフィニティークロマトグラフィーにより精製される蛋白質のうち約 24 kDa の蛋白質と抗 N24 抗血清が免疫交差反応を示すことから、N24 は GST としての酵素活性を持つことが示唆された。これらのことから、N24 は嗅細胞において GST 活性を利用した嗅覚機能に強く関わる可能性が示された。

以上の結果から、サケ科魚類嗅神経系において THR は特に銀化変態と降海行動時の嗅覚機能に、sGnRH は神経修飾物質として母川回帰時の嗅覚機能に、N24 は生体内転換酵素として嗅覚機能に関与していることが示唆された。

上述のように、本研究では、降海性サケ科魚類の嗅神経系に特異的存在する 3 種類の分子のサケの回遊に伴う挙動を世界で初めて解析し、これらの分子が有用な嗅覚指標物質であることを示した。これらの結果は、降海性サケ科魚類の母川

記銘および母川回帰を嗅覚機能から解明するために極めて重要な知見を提供した
ものとして高く評価され、本論文が博士（水産学）の学位請求論文として相当の
業績であると認定した。