

学 位 論 文 題 名

Molecular biological study on
imprinting related genes in salmon

（サケの母川記銘関連遺伝子に関する分子生物学的研究）

学位論文内容の要旨

サケは繁殖のために生まれた河川に回帰する（母川回帰）事から、日本における水産増殖上の有用対象魚の一つになっている。近年、シロザケ（*Oncorhynchus keta*）やカラフトマス（*O. gorbuscha*）の漁獲量は増加し、日本の重要な水産資源となっている。一方、ベニザケ（*O. nerka*）やサクラマス（*O. masou*）の漁獲量は回帰率が安定しないため増加せず、これら魚種の回帰率を向上させる増殖法の確立が求められている。サケは稚魚期に生活した河川のニオイを記憶（母川記銘）して降海し、海で数年間成長した後、その記憶を想起する事により母川回帰を可能にしている。そのため、母川記銘機構の解明がサケ増殖事業の重要な課題の一つとなっている。

サケの母川記銘に関して行動学や電気生理学など多くの分野から研究が行われ、母川記銘はパーからスモルトへの移行（parr-smolt transformation; PST）期に起こると考えられており、嗅神経系（嗅上皮、嗅神経、嗅球）が重要な役割を果たす事が示唆されている。哺乳類において、記憶に関する研究は分子生物学の分野で精力的に行われているが、サケの母川記銘に関して分子生物学からのアプローチは殆ど無い。本研究では、サケの母川記銘機構を分子生物学的手法により解明する事を目的とし、PST期の嗅神経系で母川記銘に関与する遺伝子の単離を試みた。

【cDNA-representational differential analysis (cDNA-RDA) による母川記銘関連遺伝子の単離】

母川記銘に関与する遺伝子の単離はcDNA-RDAより行った。供試魚にはPST期および索餌回遊時期のヒメマスの嗅球を用いた。索餌回遊時期の嗅球に比べPST期の嗅球で発現量が多い遺伝子をcDNA-RDAにより濃縮し、母川記銘に関与する遺伝子の候補を検索した。その結果、PST期の嗅球で発現量が多い2種類のクローン（クローン2およびクローン3）を単離した。本研究ではクローン2をsockeye salmon olfactory imprinting related gene (SOIG)、クローン3をsalmon glutamate carboxypeptidase (sGCP)と命名し、それら遺伝子の特徴をヒメマス、サクラマス、シロザケ、カラフトマスおよびニジマス（*O. mykiss*）を用いて解析した。

【SOIGの解析】

ノーザンブロット法により、ヒメマスの脳6領域（嗅球、終脳、視床下部、視蓋、小脳、延髄）および体組織9部位（嗅上皮、鰓、肝臓、心臓、頭腎、脾臓、筋肉、消化管、精巢）におけるSOIG mRNAの発現部位を解析した。その結果、SOIG mRNAの発現は嗅上皮のみに認められた。また、*in situ* ハイブリダイゼーション法により、SOIG mRNAは嗅上皮の嗅細胞と基底細胞に局在する事が明らかとなった。しかし、嗅球におけるSOIG mRNAの発現は両手法では認められなかった。そこで、嗅球におけるSOIG mRNAの発現をRT-PCRにより解析した。その結果、約50サイクルでSOIG mRNAの弱いシグナルが確認され、嗅球におけるSOIG mRNAの発現量は低いことが明らかとなった。これより、本研究では嗅球におけるSOIGの遺伝子解析は困難であると判断し、SOIGの解析を嗅上皮において行うこととした。

SOIG の配列解析を行うために、嗅上皮 cDNA ライブラリーより全 SOIG cDNA を単離した。SOIG は予想される翻訳領域 252 アミノ酸残基を含む全長 1,700 bp からなり、ドメイン解析より SOIG には Ly-6 superfamily ドメインが存在する事が明らかとなった。Ly-6 superfamily は多くの生物から単離されているが、その詳細な機能に関しては不明である。しかし、近年 Ly-6 superfamily に属する遺伝子が細胞の分化や嗅覚の神経修飾物質として機能する事が報告された。これらの結果、嗅上皮の基底細胞および嗅細胞に局在する SOIG は、ヒメマスの基底細胞から嗅細胞への分化もしくは嗅神経系の神経修飾に関与する可能性が示唆された。

サクラマス、シロザケ、カラフトマスおよびニジマスの嗅上皮から SOIG mRNA のホモログの単離、および組織での発現部位を解析した。その結果、SOIG に対して高い相同性を示し、Ly-6 superfamily ドメインを含む遺伝子を単離した。また、これら遺伝子の発現部位は SOIG と同様に嗅上皮のみであった。これより、SOIG はサケ科魚類の嗅上皮で共通に発現する遺伝子の可能性が示唆された。

リアルタイム PCR により、ヒメマスおよびシロザケの各生活史段階における SOIG mRNA の発現量を解析した。ヒメマスにおいて、SOIG mRNA の発現量は初期発生に伴って上昇する傾向を示し、孵化後に急激に増加した。浮上から PST 期後および成熟に伴う SOIG mRNA 量の変化は、PST 期の嗅上皮で高値を示したが、成熟に伴う変化に有意な差は認められなかった。シロザケにおいて、降下回遊時期の嗅上皮における SOIG mRNA 量は、5 月に著しい上昇を示した。一方、母川回帰に伴い SOIG mRNA 量は増加する傾向を示し、産卵直前で高値を示した。これらの結果より、SOIG はヒメマスでは PST 期、シロザケでは降下回遊および母川回帰の最終段階の嗅覚機能に関与する遺伝子の可能性が示唆された。

【sGCP の解析】

ヒメマスの脳 6 領域および体組織 9 部位を用いて、半定量的に sGCP mRNA の発現部位を解析した。その結果、sGCP mRNA は脳 6 領域、心臓、消化管、頭腎および精巣に発現していた。sGCP の配列解析を行うために、脳 cDNA ライブラリーより全 sGCP cDNA を単離した。sGCP は予想される翻訳領域 407 アミノ酸残基を含む全長 1,803 bp からなり、M20 peptidase family ドメインおよび 6 箇所の亜鉛結合部位が保存されている事が明らかとなった。この family に属する遺伝子は亜鉛により活性を示す特徴を有するが、詳細な機能は未解明である。一方、M28 peptidase family に属する glutamate carboxypeptidase II (GCP II) は哺乳類の脳内で神経修飾物質として機能することが知られている。GCP II にも亜鉛結合部位が存在し、亜鉛による活性を有する。本研究で得られた sGCP の発現部位は、過去に報告されている GCP II の発現部位と一致した。これより、sGCP は亜鉛により活性を示し、ヒメマスの脳内では神経修飾に関与する遺伝子の可能性が示唆された。

以上の結果、サケの嗅神経系より単離した SOIG はサケの PST 期および母川回帰の嗅覚機能もしくは嗅細胞の分化に関与する遺伝子、sGCP は M20 peptidase family に属し、神経修飾に関与する遺伝子である可能性が示唆された。しかし、これら遺伝子のタンパクとしての機能解析、そして母川記銘および母川回帰との関与を解明するための実験系の確立が今後の課題として残された。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 田 宏

副 査 教 授 山 羽 悦 朗

副 査 助 教 授 工 藤 秀 明

副 査 教 授 山 下 正 兼 (生命科学学院)

学 位 論 文 題 名

Molecular biological study on imprinting related genes in salmon

(サケの母川記銘関連遺伝子に関する分子生物学的研究)

サケは繁殖のために母川に回帰する事から、日本における水産増殖上の有用対象魚の一つになっている。近年、シロザケ (*Oncorhynchus keta*) やカラフトマス (*O. gorbusha*) の漁獲量は増加し、日本の重要な水産資源となっている。一方、ベニザケ (*O. nerka*) やサクラマス (*O. masou*) の漁獲量は回帰率が安定しないため増加せず、これら魚種の回帰率を向上させる増殖法の確立が求められている。サケは稚魚期に生活した河川のニオイを記憶 (母川記銘) して降海し、海で数年間成長した後、その記憶を想起する事により母川回帰を可能にしている。そのため、母川記銘機構の解明がサケ増殖事業の重要な課題の一つとなっている。

サケの母川記銘はパーからスモルトへの移行 (parr-smolt transformation; PST) 期に起こると考えられており、PST 期の嗅神経系 (嗅上皮、嗅神経、嗅球) が母川記銘に重要な役割を果たす事が唆されている。本研究では、サケの母川記銘機構を分子生物学的手法により解明する事を目的とし、PST 期の嗅神経系で母川記銘に関与する遺伝子の単離を試みた。

【cDNA-representational differential analysis (cDNA-RDA) による母川記銘関連遺伝子の単離】

試料には PST 期および索餌回遊時期のヒメマスの嗅球を用いた。cDNA-RDA により、索餌回遊時期よりも PST 期の嗅球で発現量が多い2種類の遺伝子を単離した。本研究では、これら遺伝子を sockeye salmon olfactory imprinting related gene (SOIG)、および salmon glutamate carboxypeptidase (sGCP) と命名し、解析を行った。

【SOIG の解析】

ノーザンブロット法および *in situ* ハイブリダイゼーション法により、SOIG はヒメマスの嗅上皮のみに発現し、嗅上皮の嗅細胞と基底細胞に局在する遺伝子である事が明らかとなった。しかし、嗅球における SOIG の発現は両手法では認められなかった。嗅球における SOIG の発現を RT-PCR により解析した結果、SOIG の嗅球での発現量は低い事が明らかとなった。これより、嗅球からの SOIG の解析は困難であると判断し、本研究では SOIG の解析を嗅上皮において行った。SOIG は翻訳領域 252 アミノ酸残基を含む全長 1,700 bp で構成されていた。ドメイン解析の結果、SOIG には細胞の分化や

嗅覚の神経修飾に関与する Ly-6 superfamily ドメインが存在する事が明らかとなった。これより、SOIG は基底細胞から嗅細胞への分化もしくは嗅神経系の神経修飾に関与する遺伝子の可能性が示唆された。

シロザケ、サクラマス、カラフトマスおよびニジマス (*O. mykiss*) からの SOIG ホモログの単離、および組織での発現部位を解析した。その結果、嗅上皮のみに発現し、SOIG に対して高い相同性を示す遺伝子を各魚種より単離した。これより、SOIG はサケ科魚類の嗅上皮で高度に保存されている遺伝子の可能性が示唆された。

ヒメマスおよびシロザケの各生活史段階における SOIG mRNA の発現量を、リアルタイム PCR により解析した。ヒメマスにおいて、嗅上皮における SOIG mRNA の発現量は PST 期で高値を示し、シロザケにおいては、降下回遊時期の 5 月および母川回帰に伴って増加する傾向を示した。これらの結果より、SOIG はサケの母川記銘時期および母回帰時期の嗅上皮において、重要な役割を果たす可能性が示唆された。

【sGCP の解析】

半定量的 RT-PCR 法により、sGCP は脳、心臓、消化管、頭腎および精巢に発現する遺伝子である事が明らかとなった。sGCP は翻訳領域 407 アミノ酸残基を含む全長 1,803 bp で構成されており、アミノ酸配列には M20 peptidase family ドメインおよび 6 箇所の亜鉛結合部位が存在した。この family に属する遺伝子は亜鉛により活性を示す特徴を有するが、詳細な機能は未解明である。一方、M28 peptidase family に属する glutamate carboxypeptidase II (GCP II) は亜鉛により活性を示し、哺乳類の脳内で神経修飾物質として機能することが知られている。本研究で得られた sGCP の発現部位は、過去に報告されている GCP II の発現部位と一致した。これより、sGCP は亜鉛により活性を示し、ヒメマスの脳内では神経修飾に関与する遺伝子の可能性が示唆された。

以上のように、本論文はこれまで殆ど解析されなかったサケの母川記銘関連遺伝子に新知見を提供しており、その成果は水産科学の基礎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。