

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450279

研究課題名(和文)次世代シーケンサーでの網羅的遺伝子発現解析によるサケ脳の母川刷込関連分子の探索

研究課題名(英文)Transcriptional profiling of olfactory imprinting-related molecules in chum salmon brain using next-generation sequencer

研究代表者

工藤 秀明(Kudo, Hideaki)

北海道大学・水産科学研究院・准教授

研究者番号：40289575

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：サケ属魚類の母川刷込関連分子を解明するために次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析により、サケ(シロザケ)嗅覚中枢で上方制御の発現を示す遺伝子を探索した。刷込に関わる降海回遊期の幼稚魚、想起に関わる遡上回遊期の成魚の嗅球-終脳を用いた。両回遊期のなかでそれぞれ高い発現を示す配列は、降海回遊期では、シナプス形成や細胞増殖・分化に関わる分子、遡上回遊期には、神経伝達物質の受容体が選抜された。降海回遊期の嗅覚中枢では、シナプス可塑性や神経細胞の増殖が活発化して刷込が行われること、遡上回遊期には、想起に関わる多様な神経伝達物質による情報伝達が盛んに行われ、母川識別している可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, genes involved in olfactory imprinting (OI) and memory retrieval (OMR) were searched in the chum salmon olfactory center. Transcriptome analyses using next-generation sequencer were carried out on olfactory center of the seaward migration (OI period) juveniles and the homeward migration (OMR period) adult salmon. In each period of seaward and homeward migration, these genes indicates the minimum expression at the silent stage, and indicated expression higher than 10 fold from silent stage at active stage. In this selective condition, the same genes were not contained in both selected transcripts. The molecules of pre-synaptic vesicle exocytosis, cell-growth/differentiation, etc. were included in the OI-related candidate genes. On the other hand, some neurotransmitter receptors were included in the OMR-related candidate genes. Our results suggest that different gene groups are mainly functioning to OI and OMR in Pacific salmon.

研究分野：魚類生理学

キーワード：サケ 母川回帰 嗅覚 刷込 脳 嗅球 終脳 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

遡河性回遊魚であるサケ属魚類 *Oncorhynchus* spp. (以下, サケ類) は, 河川で孵化した後, 種により開始の年齢は異なるが降河し, 海洋で索餌回遊・成長した後産卵のために母川回帰・産卵遡上することが知られている。この特徴的な生活史を利用し, 我が国では, 人工孵化放流事業が積極的に行われ, 現在では北海道をはじめとする北日本の多くの河川においてサケ (シロザケ; *O. keta*) が回帰・遡上している。母川回帰の終盤には, 降河時に刷込まれたニオイの記憶を頼りに母川識別をするという「嗅覚刷込」説がギンザケ (*O. kisutch*) を用いた嗅覚遮断-標識放流実験により提唱されている。同じくギンザケ降海時の嗅覚刷込には, 刷込に特異的な時期や臨界期がある可能性が示されている。しかしながら, サケ類の嗅覚刷込の全容は未だ不明点が多く, その中でも母川情報を刷込む降河時や母川識別を行う産卵遡上時 (以下, 母川刷込関連時期) に嗅神経系および脳でどのような生理学的現象が起き, どのような機序で刷込が形成されるかについての情報は非常に不足している。近年, サケ類において, 野生魚と孵化場魚との何らかの生物学的相互作用が指摘されているなかで, 母川回帰の最も鍵となる母川刷込の機構が不明なまま生態系へのヒューマンインパクトになる人工ふ化放流事業を継続することは, これからの生態系ベースの水産科学の観点からも問題があるものと思われる。

サケ類において嗅覚の情報は, 嗅覚器官である嗅房の嗅上皮中の嗅細胞が有するニオイ受容体が水中のニオイ物質を受容し, その情報は各々の嗅細胞から脳へ一本投射する軸索を介して嗅覚の一次中枢である嗅球に伝達される。その情報は, 嗅球内でチューニングを受けより高次中枢に情報が伝達されると考えられている。嗅球と接する終脳は高等脊椎動物では大脳に相当し, 記憶に関わる脳部位とされている。しかしながら, これらの機序のほとんどは他生物の知見から推定されているもので, サケ自身で明らかにされている知見は少ない。サケ類の脳における分子レベルの研究は神経内分泌学的な研究

等は進んでいるが, 嗅神経系の研究は限られている。近年, 分子生物学的技術の急速な発達により微量組織における遺伝子発現の網羅的解析が可能となり, 大量の遺伝子発現情報を得ることができるようになった。実際, 属レベルで異なるタイセイヨウサケ (*Salmo salar*) の海水適応に着目した研究では, DNA チップを用いた網羅的遺伝子発現解析により銀化変態期 (降河時) 前後の嗅房で増減する遺伝子が米国の研究者により報告されている。

2. 研究の目的

本研究ではサケ類の母川刷込前後や回帰時のニオイを想起する前後に嗅覚に関わる脳部位内で発現が消長もしくは大きく変化する分子群を次世代シーケンサー (NGS) を用いた網羅的遺伝子発現解析により探索し, 母川刷込の全容解明のブレークスルーに繋がる分子を同定することを目的とする。さらに, その各分子の脳内における時空間的に詳細な発現解析に着手し, 母川刷込の脳内分子メカニズムの解明を目指すものである。

3. 研究の方法

(1) 刷込に関わる降海回遊期セットとして, 降海前, 中, 後の幼稚魚をトランスクリプトーム (RNA-Seq) 解析に用いた。想起に関わる遡上回遊期セットとして, 遡上前, 中, 後の親魚を用い, 併せて, 刷込・想起に静的な状況の外洋索餌回遊中の未成熟魚を同解析に用いた。それぞれ採集の際に魚体測定後, 供試魚から嗅覚中枢 (嗅球-終脳) 組織を剖出し, 分析まで RNA 保護液で冷凍保存した。

(2) NGS による RNA-Seq 解析は, 全 RNA から cDNA ライブラリーを作製し, ブリッジ PCR により DNA を増幅後, 次世代シーケンサー HiSeq2000 を用いてペアエンド法により解析した。リードのクオリティコントロール後, de novo アセンブリによりコンティグを得てリードマッピングを行い, 相対的転写物濃度 (FPKM 値) による発現量分析を行った。

(3) 降海回遊期セットでは, 降海後標本で最低, 降海中標本で最大の発現を示す配列に着目した。遡上回遊期セットでは, 索餌中個体で最低, 遡上前で最大の発現を示す配列に着目した。選抜された遺伝子配列は, 遺伝子情報データベースによる既知遺伝子

との相同性検索から機能を類推し、FPKM値による標本・個体別の遺伝子発現を比較した。

(4) 母川想起関連候補分子として、遡上回遊期雄における γ -アミノ酪酸 (GABA) 受容体およびアセチルコリン受容体の発現量をリアルタイム PCR 装置により融解曲線分析し、比較 Ct 法である $\Delta\Delta Ct$ 法で相対発現量を定量した (qPCR)。

4. 研究成果

(1) 降海回遊期セットでは、降海後標本より降海中標本の方が 10 倍以上高い FPKM 値を示したものは 108 配列であった。既知の遺伝子配列との相同性検索の結果、シナプス伝達の機能維持やシナプス形成に関わる分子や神経系の発達時期であることを反映して細胞増殖・分化に関わる分子が多く含まれた。

(2) 遡上回遊期セットでは、索餌中個体より遡上前個体の方が 10 倍以上高い FPKM 値を示したものは 96 配列であった。相同性検索の結果、情報伝達物質の受容体を含む想起に関わると推定される分子が多数含まれていた。また、両セット間で、この選抜条件では一致する分子はなかった。

(3) 母川想起関連候補分子の遡上回遊期雄における qPCR による発現量は、GABA 受容体では 3 遡上時期間で有意差は認められなかったが、FPKM 値による発現変化と同じ発現動態を示した。アセチルコリン受容体では、遡上中個体が遡上前と遡上後個体より有意に低値を示したが、FPKM 値では遡上後個体での増加は認められなかった。

(4) 刷込を想定した降海時期は、シナプスの開口放出に関わる分子が選抜されたが、母川想起を想定した遡上時期では、神経伝達物質の受容体が多かった。このことから、脳の成長が完了している想起時期の親魚は、シナプス可塑性等に関わる分子よりも、哺乳類の海馬で記憶や学習に関わると推定される多様な神経伝達物質の受容体の発現を高めることで多くの神経回路を利用し、母川を認識している可能性が考えられた。また、サケの降海回遊時の刷込と遡上回遊時の想起には、異なる遺伝子群が働き、それぞれ特有の神経活動が行われていることが明らかとなった。

(5) 以上より、サケ属魚類の嗅覚中枢で初めての NGS を用いた RNA-Seq 解析により、母川のニオイ記憶の刷込時期と推測される降海前後および想起時期と推測される産卵

遡上前後で、著しく発現量が増加する分子をサケで示すことができた。そして、母川回帰に関わる刷込と想起には、多数の分子が複雑に連携して機能していることが明らかとなった。

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 8 件)

1. Susuki K, Ban M, Ichimura M, Kudo H (2017) Comparative anatomy of the dorsal hump in mature Pacific salmon. *Journal of Morphology Biology*, (印刷中・電子出版済) DOI: 10.1002/jmor.20687 [査読有]
2. 工藤秀明, 越野陽介, 藤原 真, 青山智哉, 伊藤洋満 (2016) 北海道の自然産卵サケ類における耳石微量元素分析による回遊履歴情報の資源管理への応用 ～自然産卵後斃死サクラムス耳石におけるストロンチウム:カルシウム比動態の河川間比較～. *公益財団法人 北水協会 水産研究助成事業報告, 平成27年度*: 1-6. [査読無]
3. Izumi H, Hagihara S, Kurogi H, Chow S, Tsukamoto K, Kagawa H, Kudo H, Ijiri S, Adachi S (2015) Histological characteristics of the oocyte chorion in wild post-spawning and artificially matured Japanese eels *Anguilla japonica*. *Fisheries Science*, **81**: 321-329. [査読有]
4. 工藤秀明 (2015) 嗅粘膜における薬物代謝関連分子の発現とその意義 -ニオイ受容器で異物を処理する細胞たち- *Aroma Research*, **16**: 214-218. [査読無]
5. 工藤秀明, 越野陽介, 藤原 真, 青山智哉 (2015) 北海道の自然産卵サケ類における耳石微量元素分析による回遊履歴情報の資源管理への応用 ～北海道内各地域におけるサクラムス耳石標本採集状況と分析例～. *公益財団法人 北水協会 水産研究助成事業報告, 平成26年度*: 19-24. [査読無]
6. Susuki K, Ichimura M, Koshino Y, Kaeriyama M, Takagi Y, Adachi S, Kudo H (2014) Dorsal hump morphology in pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Journal of Morphology*, **275**: 514-527. [査読有]
7. Mino S, Kudo H, Arai T, Sawabe T, Takai K, Nakagawa S (2014) *Sulfurovum aggregans* sp. nov., a hydrogen-oxidizing, thiosulfate-reducing chemolithoautotroph within the *Epsilonproteobacteria* isolated from a deep-sea hydrothermal

vent chimney, and an emended description of the genus *Sulfurovum*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **64**: 3195-3201. [査読有]

8. 工藤秀明, 内 彩香, 越野陽介 (2014) 北海道の自然産卵サケ類における耳石微量元素分析による回遊履歴情報の資源管理への応用 ～砂蘭部川自然産卵後サクラマス耳石の耳石微量元素分析～. 公益財団法人 北水協会 水産学術研究・改良補助事業報告 (**平成25年度**): 31-36. [査読無]

[学会発表](計 12 件)

1. 阿部嵩志・小林正起・瀬部光太郎・工藤秀明 サケ母川刷込関連時期の嗅覚中枢におけるシナプトソーム関連タンパク 25 (SNAP25) の遺伝子発現. 平成 29 年度日本水産学会春季大会 2017 年 3 月 27 日 東京海洋大学(東京都, 港区)
2. 大門純平・綿貫 豊・工藤秀明・越野陽介 北海道太平洋側で繁殖するウトウによるサケ幼稚魚補食量の推定. 平成 29 年度日本水産学会春季大会 2017 年 3 月 27 日 東京海洋大学(東京都, 港区)
3. Abe T, Minowa Y, Kobayashi M, Kudo H Expression of synaptosome-associated protein 25 kDa (SNAP25) in the salmon brain. 17th *International Symposium on Olfaction and Taste*. June 6, 2016 パシフィコ横浜(神奈川県, 横浜市)
4. Minowa Y, Hagihara S, Abe T, Ijiri S, Adachi S, Kudo H Transcriptional profiling of olfactory imprinting in the olfactory center of Pacific salmon. 17th *International Symposium on Olfaction and Taste*. June 6, 2016 パシフィコ横浜(神奈川県, 横浜市)
5. 木村知彰・瀬部光太郎・市村政樹・井尻成保・工藤秀明・桜井泰憲 カラフトマスの鼻曲がり形成と雄性ホルモン. 第 9 回サケ学研究会 2015 年 12 月 20 日 北海道大学(北海道, 札幌市)
6. 箕輪ゆい・萩原聖士・井尻成保・工藤秀明・足立伸次 サケ前脳における母川想起関連分子の探索カラフトマスの鼻曲がり形成への雄性ホルモンの関与. 第 9 回サケ学研究会 2015 年 12 月 20 日 北海道大学(北海道, 札幌市)
7. 木村知彰・瀬部光太郎・市村政樹・井尻成保・工藤秀明・桜井泰憲 カラフトマスの鼻曲がり形成と雄性ホルモン. 第 9 回サケ学研究会 2015 年 12 月 20 日 北海道大学(北海道, 札幌市)

8. 工藤秀明 サケの嗅覚機構. 第 9 回サケ学研究会 2015 年 12 月 20 日 北海道大学(北海道, 札幌市)
9. 木村知彰・工藤秀明・市村政樹・井尻成保・桜井泰憲 カラフトマス雄の鼻曲がり形成に関する解剖生理学的研究. 平成 27 年度日本水産学会春季大会 2015 年 3 月 28 日 東京海洋大学(東京都, 港区)
10. 越野陽介・坂本清司・工藤秀明 サケの産卵遡上が河川性魚類の胃内容物に与える影響. 平成 27 年度日本水産学会春季大会 2015 年 3 月 30 日 東京海洋大学(東京都, 港区)
11. 木村知彰・市村政樹・桜井泰憲・工藤秀明 カラフトマス雄における鼻曲がりの構造について. 第 8 回サケ学研究会 2014 年 12 月 21 日 北海道大学函館キャンパス(北海道, 函館市)
12. 箕輪ゆい・福間 健・亀田圭介・國重賢二・工藤秀明 サケ (*Oncorhynchus keta*) 嗅覚器官における嗅覚型 G タンパク α サブユニットの発現. 日本味と匂学会第 48 回大会 2014 年 10 月 3 日 清水文化会館(静岡県, 静岡市)

[図書](計 1 件)

秋道智彌・家田 修・工藤秀明 津軽海峡がつなぎ、もたらすもの -青森県大間町と北海道函館市を歩く。「フィールドから考える地球の未来 地域と研究者の対話」(地球研叢書: 関野 樹 監修) 昭和堂 286 (156-172) 2016 年 4 月

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 秀明 (KUDO HIDEAKI)
北海道大学・大学院水産科学研究院
・准教授
研究者番号: 40289575

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し