HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	遡河性サケ属魚類のシナプス開口放出関連分子に関する分子神経学的研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	阿部, 嵩志
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(水産科学)
Dissertation Number	甲第14325号
Issue Date	2021-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/81828
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Takashi_Abe_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称：博士（水産科学）　　氏名：阿部　嵩志

学 位 論 文 題 目

遡河性サケ属魚類のシナプス開口放出関連分子に関する分子神経学的研究

遡河性サケ属魚類 (*Oncorhynchus* spp., 以下，サケ類) は，生まれた河川 (母川) に固有のニオイ組成を学習現象の 1 種である刷込を形成しながら降海し，海洋で成長した後，性成熟の開始とともに母川に回帰・遡上する。この母川回帰性を利用して，北日本の多くの河川で人工ふ化放流事業が行われている。日本のサケ (*O. keta*, 一般には, シロザケ) では，放流後の減耗抑制を目的とした体サイズに基づいた「適期放流」が資源量増加に寄与してきたが，母川刷込能については考慮されていない。ギンザケ (*O. kisutch*) やヒメマス (*O. nerka*) での人為的な嗅覚刷込実験では，銀化変態期が刷込期であるとされており，嗅覚刷込期は限られた時期であると考えられている。サケでは，神経伝達物質受容体の遺伝子発現が降河中に増加することが明らかにされており，嗅覚を含む環境情報の受容・伝達と刷込形成には，ニューロン間のシナプス形成による神経回路の構築が重要である。しかし，母川回帰に重要である嗅覚刷込の神経メカニズムにおいて，特にシナプス前部の神経伝達物質の開口放出に関わる神経分子については，サケ類では全く明らかにされていない。本研究では，サケ類の嗅覚刷込・想起とシナプス開口放出関連分子の発現との関連を明らかにすることを目的として，サケ類 4 種の嗅覚中枢 (嗅球+終脳) に発現する Snare 複合体構成分子 (Snare 分子; Snap25，Stx1 および Vamp2) の一次構造，サケにおける *snare* 遺伝子発現部位とサケとカラフトマス (*O. gorbuscha*) の回遊に伴う発現動態および SNARE/Snare 複合体の制御因子である足場タンパク *unc13-1* と *unc18-1* および小胞タンパク *syp* 遺伝子の発現を分子神経学的に解析した。

サケ類 *snare*/Snare 分子の一次構造

サケ，カラフトマス，サクラマス (*O. masou*) およびヒメマスの嗅覚中枢より，高等脊椎動物 SNARE 複合体構成分子ホモログの *snap25*, *stx1* および *vamp2* 全翻訳領域 (CDS) 配列

を得た。サケ類 *snap25* には，高等脊椎動物と同様にエクソン 5 選択的スプライシングによる 2 型アイソフォーム *snap25a* および *snap25b* が含まれた。*stx1* は，2 型のアイソフォーム *stx1a* および *stx1b* が得られた。*vamp2* は，サケ類ゲノムから推定されるアミノ酸配列が 111 残基と 115 残基の 2 型のうち，111 残基に相当するサブタイプが得られた。これらのサケ類 *snare* 分子の演繹アミノ酸配列には，シナプス小胞開口放出に必須である SNARE/Snare モチーフが共通して存在し，その他の領域も他の脊椎動物と比較して保存されていることから，機能的なサケ類の Snare 複合体構成分子であると考えられた。

サケ幼稚魚および親魚の嗅覚器官と脳各部位における *snare* 遺伝子の発現

リアルタイム定量的 PCR により，サケ幼稚魚および親魚の嗅覚器官 (嗅房) と脳各部位および脳下垂体において *snare* 遺伝子の発現が確認された。嗅球と終脳では，他の脳領域に比べて *snare* 遺伝子の発現が高く，嗅房でも発現が確認されたことから，嗅覚情報の伝達・処理に関わると考えられた。サケ幼稚魚脳における *in situ* ハイブリダイゼーション (ISH) では，嗅神経軸索のシナプスと結合する嗅球僧帽細胞とより高次の顆粒細胞層，終脳の嗅神経一次・二次投射領域および海馬の機能的相同領域での *snare* 遺伝子の発現が確認されたことから，サケ類でも Snare 分子は嗅覚情報の高次中枢への伝達と刷込形成に機能すると考えられた。

嗅神経系におけるサケおよびカラフトマスの回遊に伴う *snare* 遺伝子の発現変化

サケの幼稚魚から親魚までの主要な回遊ステージの嗅房, 嗅球および終脳における *snare* 遺伝子の発現は，中枢神経系の発達期でもある降海期幼稚魚で高く，嗅球と終脳では遡上期にも発現上昇した。嗅房での *snare* 遺伝子の発現は，成魚に比べて顕著な嗅細胞の増加を反映しており，幼稚魚の嗅球および終脳の嗅覚中枢では嗅細胞シナプスの形成に伴って嗅覚情報の入力が増加したことによる嗅覚回路の構築に機能したものと考えられた。この結果は，幼稚魚期の高いシナプス可塑性を示唆しているが，神経系の発達と嗅覚刷込のどちらを反映しているかは不明であった。そこで，降河中のサケ幼稚魚を耳石温度標識に基づいてふ化場からの放流日によって細分化して発現解析した結果，降河開始から間もない個体で *snare* 遺伝子の発現が高かったことから，降海期の中には特にシナプス可塑性が高い期間が存在し，嗅覚刷込に重要であると考えられた。サケと同じくふ化・浮上した春季に降海するカラフトマスは，嗅房ではサケ同様に稚魚で発現が高かったが，嗅球と終脳で

は成魚で発現上昇した分子もあり，嗅覚中枢において種間で異なる発現動態を示した。サケに比べて短期間で成長するカラフトマスでは，回帰親魚でも嗅覚中枢で高い神経可塑性を示した可能性がある。サケとカラフトマスの両種で遡上期にも *snare* 遺伝子が発現上昇することから，回帰・遡上に伴う性成熟の進行等の体内外の環境変化によって神経可塑性が亢進すると考えられた。

嗅神経系におけるサケ回遊に伴う Snare 制御因子の遺伝子発現

サケ嗅覚中枢において SNARE/Snare 複合体の制御因子である *unc13-1*，*unc18-1* の部分 CDS および *syp* の全 CDS 塩基配列を明らかにした。両 Unc には，SNARE/Snare 複合体形成の制御に関わるモチーフが一部含まれており，Syp 演繹アミノ酸配列には Vamp2 との結合に関わるモチーフが保存されていたことから，サケ類における各分子のホモログ配列の一部または全部が明らかになった。サケ幼魚の嗅房および脳各部位における Snare 制御因子は，分子によって異なる発現強度であったが，嗅房，嗅球および終脳にも発現しており，ISH でも嗅球と終脳の嗅覚関連領域での *unc13-1* 発現が確認できたことから *snare* 遺伝子と同じく嗅覚の情報伝達にも関与していると考えられた。サケの回遊に伴う発現変化は，降海期に発現が高く，親魚では低いが遡上期に発現上昇しており，*snare* 遺伝子と似た変化だった。このことから，Snare 制御因子の発現動態は，*snare* 遺伝子と同じく幼稚魚期の嗅神経系の発達と嗅覚刷込および親魚の母川識別との関連を示唆するものであった。同所的に機能するそれぞれの分子グループの発現が完全には一致しなかった結果は，mRNA 発現とタンパク発現の時間差や各タンパクの保持時間の差を考慮する必要があると考えられた。

本研究では，Snare 複合体構成分子と Snare 制御因子のサケ類嗅神経系における発現を明らかにし，回遊に伴う発現変化からは，嗅神経系の発達と嗅覚刷込形成・母川識別に関わるシナプス可塑性を反映することを示唆する結果が得られた。これらの分子の発現を分析することで，サケ類の神経可塑性の状況を把握し，幼稚魚の刷込活性を考慮した「放流適期」の見極めによる人工ふ化放流事業の高度化が可能となり，持続可能な水産生物としてのサケ類の資源保全とその利用に繋がるものと考えられる。