



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14325
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96751
Type	doctoral thesis
File Information	Takashi_Abe.pdf



主 論 文

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

A Study on Molecules that Regulate Synaptic Exocytosis
in Anadromous Pacific Salmon (*Oncorhynchus* spp.)

北海道大学大学院水産科学院
海洋生物資源科学専攻

Graduate School of Fisheries Sciences
Division of Marine Bioresource and Environmental Science

阿部 嵩志

Takashi Abe

2021 年

目 次

第 1 章 緒言.....	1
第 2 章 シナプス開口放出関連分子 (Snare 分子) の一次構造	
2-1. 背景と目的.....	8
2-2. 材料と方法.....	9
2-2-1. 供試魚.....	9
2-2-2. poly (A) ⁺ RNA の精製および cDNA 合成.....	11
2-2-3. オリゴヌクレオチド.....	11
2-2-4. cDNA クローニング.....	13
2-2-5. 塩基配列解析.....	14
2-3. 結果.....	15
2-3-1. サケ嗅覚中枢における <i>snare</i> /Snare 分子.....	15
2-3-2. カラフトマス嗅覚中枢における <i>snare</i> /Snare 分子.....	21
2-3-3. サクラマス嗅覚中枢における <i>snare</i> /Snare 分子.....	25
2-3-4. ヒメマス嗅覚中枢における <i>snare</i> /Snare 分子.....	25
2-3-5. サケ類 <i>snare</i> /Snare 分子の種間比較.....	25
2-4. 考察.....	26
第 3 章 嗅覚器官および脳における <i>snare</i> 遺伝子の発現解析	
3-1. 背景と目的.....	28
3-2. 材料と方法.....	28
3-2-1. 供試魚.....	28
3-2-2. 定量的発現解析.....	29
3-2-3. 統計解析.....	31
3-2-4. <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション.....	33
3-3. 結果.....	34
3-3-1. サケ幼稚魚の <i>snare</i> 遺伝子発現部位.....	34
3-3-2. サケ成熟魚の <i>snare</i> 遺伝子発現部位.....	34
3-3-3. サケ幼稚魚脳の <i>snare</i> 遺伝子発現細胞.....	34

3-4. 考察.....	39
第4章 嗅神経系における <i>snare</i> 遺伝子の回遊に伴う遺伝子発現変化	
4-1. 背景と目的.....	45
4-2. 材料と方法.....	46
4-2-1. 供試魚.....	46
4-2-2. 定量的発現解析.....	55
4-2-3. 統計解析.....	62
4-3. 結果.....	62
4-3-1. サケ回遊に伴う <i>snare</i> 遺伝子発現変化.....	62
4-3-2. サケ降河行動に伴う <i>snare</i> 遺伝子発現変化.....	68
4-3-3. サケ稚魚での野生魚とふ化場魚の <i>snare</i> 遺伝子発現比較.....	68
4-3-4. カラフトマス回遊に伴う <i>snare</i> 遺伝子発現変化.....	76
4-4. 考察.....	82
第5章 Snare 制御因子の遺伝子発現	
5-1. 背景と目的.....	88
5-2. 材料と方法.....	89
5-2-1. 供試魚.....	89
5-2-2. オリゴヌクレオチド.....	89
5-2-3. cDNA クローニング.....	89
5-2-4. 塩基配列解析.....	91
5-2-5. 定量的発現解析.....	92
5-2-6. <i>in situ</i> ハイブリダイゼーション.....	92
5-3. 結果.....	92
5-3-1. サケ Snare 制御因子の塩基配列.....	92
5-3-2. サケ幼稚魚の Snare 制御因子の遺伝子発現部位.....	95
5-3-3. サケ回遊に伴う Snare 制御因子の遺伝子発現変化.....	100
5-3-4. サケ幼稚魚脳の Snare 制御因子の遺伝子発現細胞.....	100
5-4. 考察.....	105
第6章 総合考察.....	108

謝辭.....	115
引用文獻.....	116

第1章 緒言

遡河性サケ属魚類 (*Oncorhynchus* spp., 以下, サケ類) は, 北海道の漁業生産額の約 19.9% (2010~2019 年「さけ」および「ます」の平均) を占める水産重要種である (北海道水産林務部 2010~2019)。サケ類は, 河川でふ化した後に降海し, 海洋での索餌回遊と成長を経て母川に回帰・遡上する (Fig. 1A)。サケ類の母川回帰性は, 我が国に分布するサケ類の中で最も漁獲量が多いサケ (一般にはシロザケ, *O. keta*) で古くから知られていた。具体的には, 同種の資源維持に産卵を行う母川での保護が重要であることを見出し, 岩手県津軽石川では少なくとも 1749 年以前, 新潟県三面川では 1763 年から「種川の制」によるサケ資源保護・造成が行われている (若菜 2004)。より積極的な資源造成としては, 1888 年の千歳中央ふ化場 (北海道千歳市) の開設から現在に至るまで「人工ふ化放流」によるサケ増殖事業が行われている。1960 年代に給餌飼育が開始され, 1960 年代後半の乾燥餌料の導入およびふ化器の開発といったふ化事業における集約飼育を可能にする技術的進歩により, 日本系サケ資源は著しく増加した。この間, 沿岸漁獲および河川捕獲尾数を合わせたサケ来遊数は, 1960 年代の 300~500 万尾から 1990 年代には 5000~6000 万尾にまで増加した (野川 2010)。このような高い資源水準は, 飼育設備の他に技術的要因として「放流適期」の概念が導入されたことが大きく寄与したと考えられている。「放流適期」は, 沿岸表面水温 5~10 °C, 幼稚魚の放流時の体重 1 g 以上を目標とされてきた (Miyakoshi et al. 2013)。この適期とは, 生残率の向上を目的として放流後に外洋の索餌海域に移動するまでの沿岸滞在時の減耗を抑制することに着目したものである。

サケ類の幼稚魚は, 降海時に母川固有のニオイを学習現象の 1 つである刷込 (imprinting) により記憶し, 成熟した親魚の母川回帰の終盤には刷込まれたニオイ記憶をもとに母川を識別することが広く知られている (嗅覚刷込説; Wisby and Hasler 1954)。サケ類の降海年齢は, ふ化後に浮上した年 (0^+ 齢) の春季の稚魚で降海するサケおよびカラフトマス (*O. gorbuscha*) と, 1 年間以上の河川生活後 (1^+ 齢以降) のスモルト (銀化) 幼魚で降海するギンザケ (*O. kisutch*), マスノスケ (*O. tshawytscha*), サクラマス (*O. masou*) およびベニザケ (*O. nerka*) に分けられる

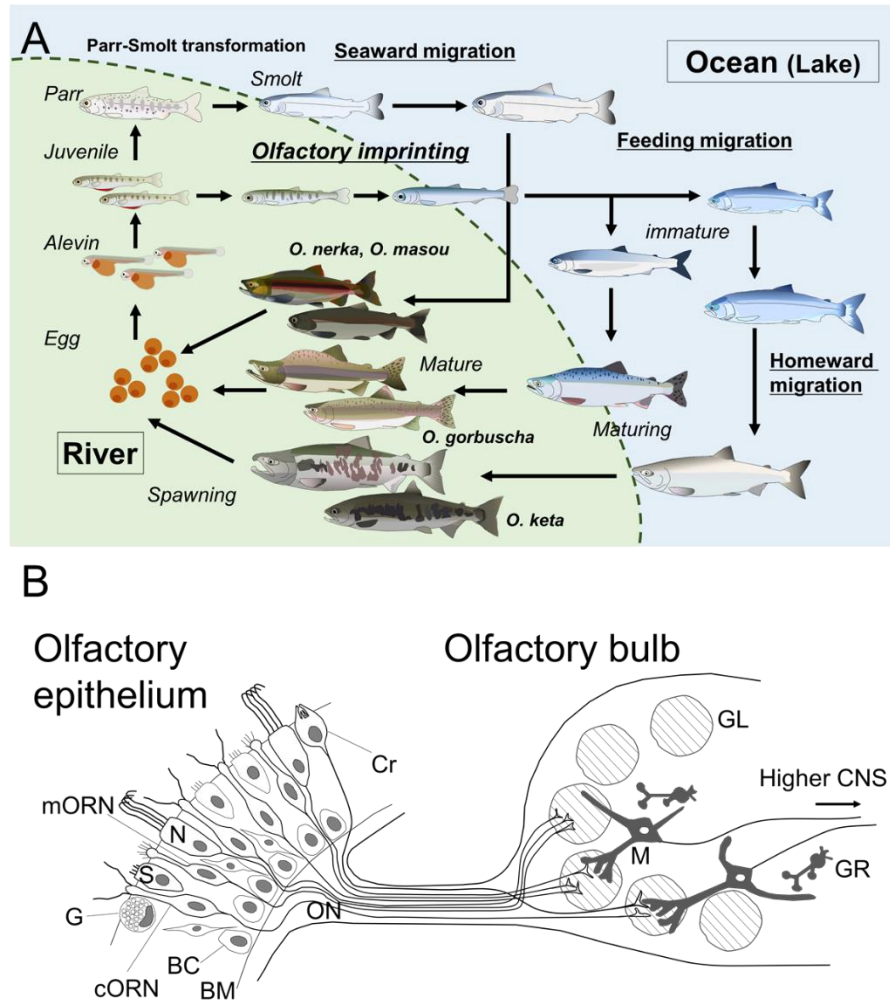


Fig. 1. Schematic illustration of salmon life history and olfactory nervous system. A: Life history of four species of anadromous Pacific salmon (Genus *Oncorhynchus*). B: The olfactory nervous system in salmonids. BC: basal cell, BM: basement membrane, CNS: central nervous system, cORN: ciliated olfactory receptor neuron, Cr: crypt cell, G: goblet cell, GL: glomerulus, GR: granule cell, M: mitral cell, mORN: microvillus olfactory receptor neuron, N: ciliated non-sensory cell, ON: olfactory nerve fiber, S: supporting cell.

(Quinn 2018)。また、属レベルで異なるタイセイヨウサケ (*Salmo salar*) も 1⁺ 齡以降の幼魚で降海する。北米では、ギンザケ幼魚の人工ニオイ物質による人為刷込・放流実験により、銀化変態 (Parr-Smolt Transformation: PST) 期が嗅覚刷込時期であると示されている (Dittman et al. 1996)。我が国のさけ・ます漁業における主要な対象種であるサケとカラフトマスは、稚魚期で降海し、スモルト幼魚で降海する種ほど外見的に明瞭な PST 期を示さないが、河川生活期が短いながらも刷込形成していると考えられる。実際に、河川生活期は極めて短いカラフトマスでも、刷込形成は可能であることが行動学的に示されている (Bett et al. 2016)。また、同一水系において、本流と支流といった異なるニオイ組成までも感知し、支流レベルで産卵場まで正確に識別・回帰することから、降海時に経験するニオイ組成の変化を順に刷込形成するという「逐次刷込説」も提唱されている (Harden Jones 1968)。これらのことから、PST 期を含む河川生活期は嗅覚刷込の感受性を有する重要な時期であると考えられる。

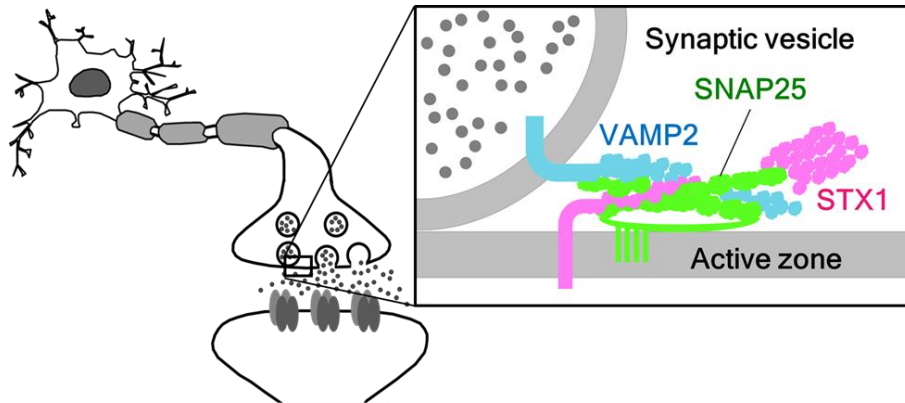
サケ類を含む真骨魚類 (Teleostei) の嗅神経系について概説する。魚類の頭部吻側の左右には、鼻腔と呼ばれる小腔があり、前鼻孔から流入した環境水は鼻腔底面にある末梢嗅覚器官の嗅房 (Olfactory rosette) に接触し、後鼻孔から流出する。嗅房の感覚上皮である嗅上皮 (olfactory epithelium) には、線毛性嗅細胞 (ciliated olfactory receptor neuron)、微絨毛性嗅細胞 (microvillus olfactory receptor neuron) およびクリプト細胞 (crypt cell) の 3 種類の嗅細胞 (嗅覚受容細胞) が存在する (Yamamoto and Ueda 1977, Hansen and Zielinski 2005, Fig. 1B)。嗅細胞は、嗅上皮自由表面に樹状突起を、基底側に軸索を伸長する双極性ニューロンであり、樹状突起の線毛や微絨毛に嗅覚受容体 (Niimura and Nei 2005) を発現している。嗅細胞の軸索は束になり第 I 脳神経である嗅神経 (olfactory nerve) となって、脳の最も吻側に位置する嗅球 (olfactory bulb) の糸球体層 (glomerulus) に直接投射する (ニジマス *O. mykiss*: Riddle and Oakley 1992, 湖沼型ベニザケ [ヒメマス]: Kudo et al. 1996b, マスノスケ: Ochs et al. 2017, Fig. 1B)。嗅球と尾側で接し、哺乳類の脳に相当する終脳 (telencephalon) は、嗅覚の高次中枢であると考えられている (真骨魚類全般: Yamamoto 2009, ヒメマス: Bando et al. 2011)。

脊椎動物全般に記憶形成には、脳内でのシナプス長期増強 (Long-Term

Potentiation: LTP) が重要である。ギンザケ PST 期には、脳内の神経伝達物質濃度が上昇し (Ebbesson et al. 1992, 1996), 降海期のサケ脳では LTP にも関わる N-メチル-D-アスパラギン酸 (N-Methyl-D-Aspartate: NMDA) 型グルタミン酸受容体を構成する NR1 サブユニット遺伝子発現が上昇することから (Ueda et al. 2016), 嗅覚刷込には活発なシナプス伝達に関連すると考えられる。ニューロンの神経終末からのシナプス伝達において、シナプス前膜アクティブゾーン (以下, アクティブゾーン) からの神経伝達物質の開口放出は、可溶性 N-エチルマレイミド感受性因子接着タンパク受容体 (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor: SNARE) 複合体により制御される。その構成分子であるシナプトソーム関連タンパク 25 (synaptosome-associated protein 25, SNAP25), シンタキシン 1 (syntaxin 1, STX1) および小胞関連膜タンパク 2 (vesicle-associated membrane protein 2, VAMP2; 別名 synaptobrevin2) は、高等脊椎動物で記憶形成や学習に必須である (Lin and Scheller 2000, Brunger et al. 2019; Fig. 2A)。VAMP2 は、シナプス小胞膜に局在することから vesicle-SNARE (v-SNARE), SNAP25 および STX1 は、小胞がドッキングするアクティブゾーンに局在することから target-membrane-SNARE (t-SNARE) に分類される (e.g., Lin and Scheller 2000)。その複合体形成に関わる立体構造は、i) SNAP25 アミノ末端側の N-SNARE, ii) 同カルボキシ末端側の C-SNARE, iii) STX1 の H3 ドメインおよび iv) VAMP2 の R-SNARE の 4 つの SNARE モチーフで構成される。各 SNARE モチーフがヘリックスを供給するコイルドコイル構造により SNARE 複合体が形成される (e.g., Sutton et al. 1998, Lin and Scheller 2000, Brunger et al. 2019)。

SNARE タンパクとシナプス形成および記憶形成との関連は、高等脊椎動物やモデル生物においてよく研究されており、ニワトリ (*Gallus gallus domesticus*) 網膜のシナプス形成と同期した SNAP25 の遺伝子およびタンパク発現 (Catsicas et al. 1991), マウス (*Mus musculus*) 終脳皮質における離乳期の固形食および化学刺激による SNAP25 タンパク発現増加が報告されている (Kawakami et al. 2012)。また、マウスでは、ホルムアルデヒドガスの反復曝露により嗅球の SNAP25a および SNAP25b タンパク発現が減少し、嗅覚記憶形成の阻害により嗅覚性埋没餌探索行動が阻害される (Zhang et al. 2014)。遺伝子組換えマウスでは、*Stx1a*-ノックアウト

A



B

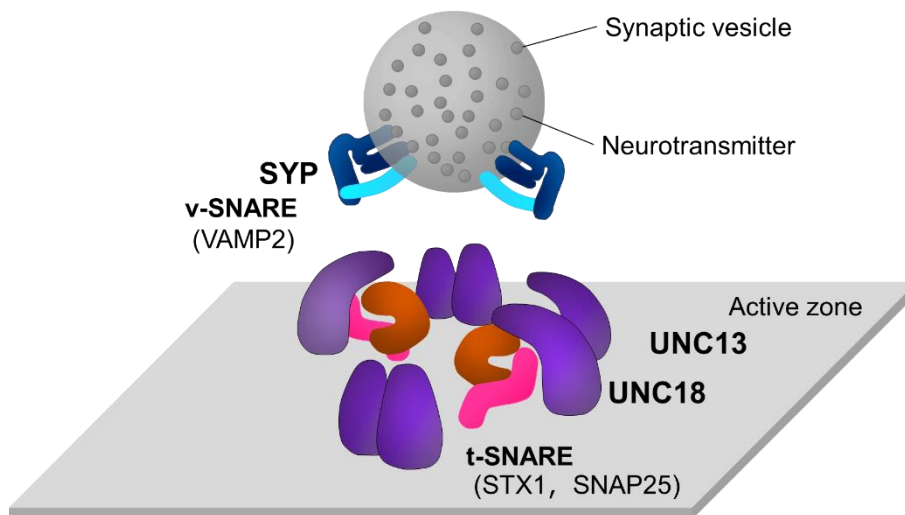


Fig. 2. A: Schematic illustration of the exocytosis of a neurotransmitter in a neuron. Enlarged view of “priming” regulated by SNARE complex, synaptosome-associated protein-25 (SNAP25; green), syntaxin-1 (STX1; pink) and vesicle-associated membrane protein 2 (VAMP2/synaptobrevin-2; light blue). B: Schematic illustration of the scaffolding of STX1 by uncoordinated-18 isoform-1 (UNC18-1; orange), transformation of STX1 form closed to open conformation regulated by uncoordinated-13 isoform-1 (UNC13-1; purple), and synaptic vesicle proteins, VAMP2 (light blue) and synaptophysin (SYP; dark blue).

(-KO) による非致死性のシナプス可塑性低下 (Fujiwara et al. 2006), *Stx1b*-KO および同ノックダウンによる致死的な脳の形態形成不全および開口放出阻害とアクティブゾーンの縮小が示されている (Arancillo et al. 2013, Kofuji et al. 2014)。また, ラット (*Rattus norvegicus*) の迷路実験では, 場所と報酬 (餌) を関連付けた記憶の保持に関わる大脳前頭前皮質と側坐核被殻部における高い *Stx1b* 発現から, STX1b は神経活動の指標としての有用性も示されている (Davis et al. 1996)。VAMP2 は, アクティブゾーンに局在する t-SNARE と複合体を形成することにより開口放出を制御する (Horikawa et al. 1993)。SNAP25-VAMP 複合体は, ラット海馬ニューロン初代培養細胞において放出後のシナプス小胞エンドサイトーシスによる膜のリサイクルへの関与が示されている (Zhang et al. 2013)。これらのことから SNARE タンパクは, シナプス開口放出のみならずシナプス小胞リサイクリングを含むアクティブゾーンにおける神経伝達物質放出の複数の過程に関与している。

アクティブゾーンにおける SNARE 複合体の形成は, 複数のタンパクにより制御されている (Fig. 2B)。STX1 は, アクティブゾーンにおいて足場タンパク (scaffold protein) と呼ばれる Mammalian uncoordinated 18 isoform 1 (MUNC18-1/Unc18-1) によって N-末端ドメインが折りたたまれた状態 (Closed conformation) で保持される。同じく足場タンパクである Mammalian uncoordinated 13 isoform 1 (MUNC13-1/Unc13-1) の触媒作用で STX1 N-末端ドメインの折たたみ構造が開かれる (Open conformation) ことにより, SNARE モチーフへの SNAP25 および VAMP2 の結合が可能になる (Dulubova et al. 1999, Richmond et al. 2001)。STX1 と SNAP25 は SNARE 複合体形成の過渡的な状態として t-SNARE 複合体を形成する (Yang et al. 2015, Palfreyman and Jorgensen 2017)。MUNC18-1 と STX1 は両者が 1:1 で結合し (Hata et al. 1993), MUNC18-1 の立体構造も STX1 の閉構造の保持に機能することを示している (Misura et al. 2000, Burkhardt et al. 2008)。VAMP2 は, シナプス小胞膜上で Synaptophysin (SYP) と結合して保持されている (Wiedenmann and Franke 1985, Jahn et al. 1985, Edelmann et al. 1995)。また, MUNC13-1 は, SNARE 複合体の足場となって開口放出を行う場所の数を調整しシナプスの情報量を制御する機能が示されている (Sakamoto et al. 2018)。

以上のように, 哺乳類をはじめとする他生物では詳細に SNARE/Snare 複合体と

その制御因子の分子構造およびシナプス開口放出の制御に関わる機能が詳細に明らかにされており、魚類ではゼブラフィッシュ (*Danio rerio*) 等のモデル魚における分子進化が明らかにされ、シナプス可塑性の指標としても用いられている (Kloepper et al. 2008, Biehlmaier et al. 2003)。しかしながら、サケ類ではゲノム情報から推定される塩基配列情報はあるが、実際の発現状況については全く不明である。これらのことから、サケ類の母川刷込における刷込・想起の分子神経メカニズムの解明には、他生物でシナプス開口放出に関わりシナプス前部で機能する神経分子群の存在とその動態を明らかにして、刷込・想起への関与を示す必要がある。本研究では、持続可能性水産生物としてサケ類の資源保全と利用を進めていくため、人工ふ化放流事業での「放流適期」の見極めに繋がるサケ類の嗅神経系における Snare および Snare 制御因子の遺伝子発現動態を解明し、嗅覚刷込期におけるシナプス前部の神経分子と刷込・想起との関連を明らかにすることを目的とした。特に、サケ類における回遊パターンの種差に着目し、*snare* 遺伝子の発現動態から種間で共通する刷込形成と想起に関わる脳内の分子神経メカニズムを明らかにするために、第 2 章では、サケを始めとする 4 種のサケ類の嗅覚中枢において SNARE/Snare 分子の一次構造解析、第 3 章ではサケ幼稚魚嗅覚中枢における *snare* 遺伝子の発現状況を解析し、第 4 章ではサケおよびカラフトマス嗅神経系における各回遊ステージでの *snare* 遺伝子の定量的発現解析を行い、第 5 章ではサケにおける足場タンパクを含む Snare 複合体の制御因子の遺伝子発現動態を解析した。総合考察では、以上を総括し、サケ類の分子神経学的研究により得られた基礎的知見がふ化放流事業の高度化と持続可能性の向上に活用することが可能であるかの検討を含めて考察した。

第2章 シナプス開口放出関連分子 (Snare 分子) の一次構造

2-1. 背景と目的

脊椎動物の中樞神経系神経細胞におけるシナプス前部のアクティブゾーンでは, SNARE モチーフを持つタンパクである SNARE スーパーファミリータンパクの SNAP25, STX1 および VAMP2 が開口放出に機能する (Lin and Scheller 2000)。これらの SNARE 分子は, SNARE モチーフのコイルドコイル構造によってシナプス開口放出マシンとして機能する SNARE 複合体を形成する (Sutton et al. 1998, Chen and Huang 2007, Brunger et al. 2019)。SNAP25 (synaptosome-associated protein 25) は, ニワトリ網膜のシナプトソーム画分から同定された N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF) 親和性の分子量 25 kDa のタンパクである (Bark 1993)。脊椎動物 SNAP25/Snap25 では, エクソン 5 の選択的スプライシングにより生じた 2 型のアイソフォーム (SNAP25a/Snap25a, SNAP25b/Snap25b) が存在する (e.g., ニワトリ; Bark 1993, ヒト *Homo sapiens*; Bark and Wilson 1994, ゼブラフィッシュ; Risinger et al. 1998)。両アイソフォームは機能分化が示唆されており (Delgado-Martínez et al. 2007), げっ歯類 (Rodent) 脳では, SNAP25a と SNAP25b で発現脳領域および発生初期における発現時期が異なる (Bark et al. 1995, Boschert et al. 1996, Johansson et al. 2008, Prescott and Chamberlain 2011, Yamamori et al. 2011)。syntaxin 1 (STX1) は, ラット網膜のアマクリン細胞より HPC-1 として同定された分子量 38 kDa のタンパクであり (Inoue et al. 1992), 少なくとも 16 種類が存在する STX ファミリータンパクの中樞神経系に発現するアイソフォームである (Bennet et al. 1992, Teng et al. 2001)。VAMP2 は, ラット脳よりシナプス小胞タンパクとして同定された分子量が約 13 kDa のタンパクである (Elferink et al. 1989)。VAMP アイソフォームのうち VAMP2 は, 脳全体で発現することから (Trimble et al. 1990, Raptis et al. 2005), 中樞神経系全般におけるシナプス伝達に機能すると考えられる。魚類 *snare* 遺伝子は, ゲノム情報に基づいてゼブラフィッシュとキンギョ (*Carassius auratus auratus*) で *snap25* の分類群独自の分子進化が推定されている (Risinger and Larhammar 1993, Risinger et al. 1998)。また, 分子系統学的にも魚類には, 他の脊椎動物同様にシナプス小胞開口放出および内分泌にも関与する Snare 分子が存在す

ることが示されている (Kloepper et al. 2008)。ゼブラフィッシュ Snare 分子は、初期発生時の視細胞形成に関与し (Biehlmaier et al. 2003)、イシビラメ (*Scophthalmus maximus*) ビブリオ感染個体では、白血球からの炎症性サイトカインの放出に Vamp2 が関与している (Chai et al. 2006)。このように、真骨魚類を含む脊椎動物において SNARE/Snare 分子は、ニューロン以外の細胞種においても開口放出に機能し、神経系ではシナプス可塑性のマーカー分子としても利用されている。しかしながら、サケ類の脳や嗅覚器官といった神経系における Snare/snare 分子の発現は確認されていない。そこで本章では、サケ類嗅神経系におけるシナプス開口放出に関わる Snare 複合体構成分子の発現および分子構造を明らかにするため、サケ類 4 種の嗅覚中枢において *snap25*, *stx1* および *vamp2* の cDNA クローニングを行った。

2-2. 材料と方法

2-2-1. 供試魚

実験には、下記の 4 種のサケ類を用いた。その外部形態を Fig. 3 に示す。サケ (シロザケ) *snare* 遺伝子 cDNA クローニングには、渡島管内さけ・ます増殖事業協会上磯ふ化場より供与されたサケ幼稚魚 (尾叉長 [FL]: 53.8 ± 0.54 mm, 体重 [BW]: 1.17 ± 0.04 g) を用い、嗅覚中枢 (嗅球+終脳) 30 個体分をプールして 1 サンプルとした。カラフトマスは、北太平洋西部での本学部附属練習船おしよろ丸 V 世 (1,989 t) の実習航海にて手釣りにより採集した索餌回遊中の未成熟雄 (FL: 400 mm, BW: 570 g) より得た嗅球を用いた。サクラマスおよびヒメマスは、本学北方生物圏フィールド科学センター洞爺臨湖実験所で 2 年間飼育されていた池産サクラマス (FL: 218 mm, BW: 91.3 g) および池産ヒメマス (FL: 201 mm, BW: 90.6 g) の 2⁺ 齢雄を用いた。サクラマスは嗅球、ヒメマスは嗅球または終脳を用いた。各供試魚は、炭酸ガス水 (10 g/L クエン酸, 20 g/L 炭酸水素ナトリウム混合水) により不動化した後、上記組織を剖出した。得られた組織は、RNA 保護保存液 (RNAlater; Invitrogen 社) に 4 °C で一晩浸漬し、-30 °C で冷凍保存した。

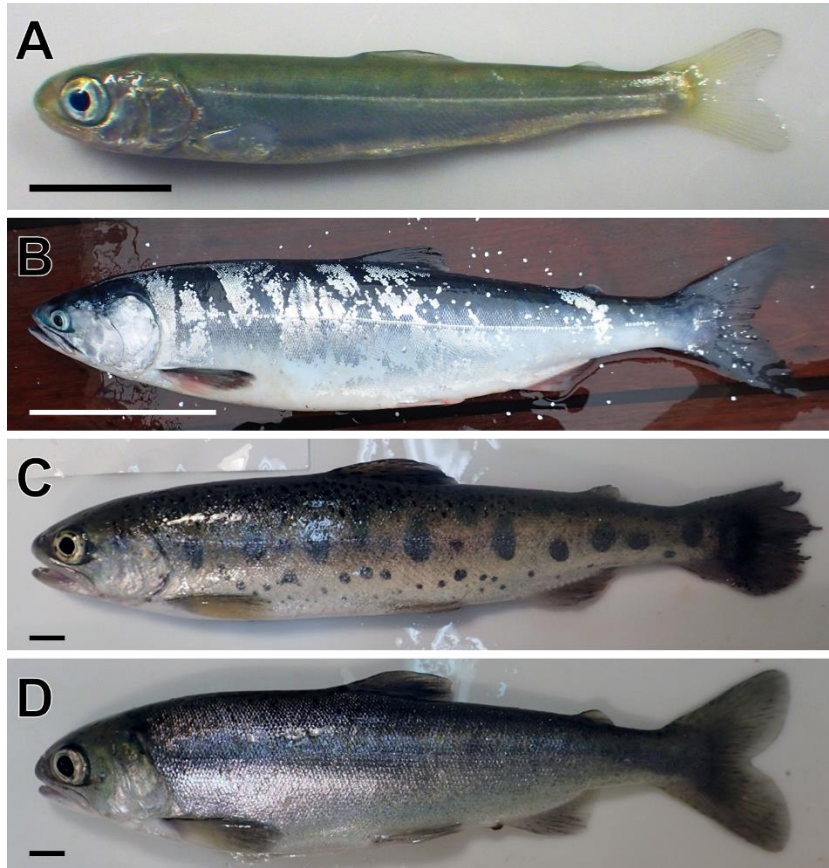


Fig. 3. External morphology of sample fish examined for molecular cloning of salmon synaptosome-associated protein-25 (*snap25*), syntaxin-1 (*stx1*) and vesicle-associated membrane protein 2 (*vamp2*). A: juvenile chum salmon provided by Kamiiso Hatchery, April 2015, B: age 2 immature pink salmon collected from Northwest Pacific Ocean, May 2018, C: age 2 masu salmon reared in spring water tank at Toya Lake Station, Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido University, July 2018, D: age 2 sockeye salmon reared in spring water tank at Toya Lake Station, July 2018. Scale bars: 10 mm for A, C, and D, 100 mm for B.

2-2-2. poly (A)⁺ RNA の精製および cDNA 合成

サケ類の上記脳組織からディスポーザブルマイクロチューブタイプホモジナイザー (TaKaRa BioMasher Standard; タカラバイオ社) と ISOGEN (ニッポンジーン社) を用いて全 RNA を抽出し, RNA Clean-up Kit (Macherey-Nagel 社) で高度に精製した。NanoDrop 1000 (Thermo Scientific 社) を用いて全 RNA 濃度および純度測定を行った。

抽出した全 RNA より Oligo-dT ビーズ (Oligotex-dT30<super>; タカラバイオ社) による poly (A)⁺ RNA の精製を行い, これを鋳型として, Random Primer pd.(N)₆ (タカラバイオ社) および逆転写酵素 (PrimeScript Reverse Transcriptase; タカラバイオ社) を用いた逆転写 (RT) 反応により鋳型 1 本鎖 cDNA を合成した。RT 条件は, 変性反応 30 °C 10 分, アニールリング 60 °C 60 分, 伸長反応 70 °C 15 分とし, サーマルサイクラー (GeneAmp PCR System 9700; Applied Biosystems 社) を用いて行った。

2-2-3. オリゴヌクレオチド

cDNA クローニングに用いるプライマーの作製には, 配列情報の入手はアメリカ合衆国立生物工学情報センターの遺伝子情報データベース (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), プライマーの設計には Primer3Plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) および Multiple Primer Analyzer (<https://www.thermofisher.com/jp/ja/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/molecular-biology-learning-center/molecular-biology-resource-library/thermo-scientific-web-tools/multiple-primer-analyzer.html>) を利用した。タイセイヨウサケ *snap25a* (NM00173949.1), ギンザケ *stx1a* variant x2 (XM020485573.1), ニジマス *stx1b* (AY319305.2) およびギンザケ *vamp2* (XM020464331.1) の配列を参照し, フォワードとリバース側の各プライマーを設計した (Table 1)。サクラマス *stx1a* のクローニングには, サケで得た配列と他のサケ類のゲノム由来配列を参照して同じ塩基配列部位にリバース側プライマーを作製した。プライマーとして用いるオリゴヌクレオチドの作製には, 受託生産サービスを利用し (シグマアルドリッチ社), 脱塩により精製された乾燥粉末を 100 μM となるようにトリス-エチレンジアミン四酢酸バッファーにより溶解し, PCR

Table 1. Primer sets used in RT-PCR for cDNA cloning of synaptosome-associated protein 25 isoform-a (*snap25a*) and isoform-b (*snap25b*), syntaxin isoform-1a (*stx1a*) and isoform-1b (*stx1b*), and vesicle-associated membrane protein isoform-2 (*vamp2*) in chum salmon, *Oncorhynchus keta*, pink salmon, *O. gorbuscha*, masu salmon, *O. masou*, lacustrine sockeye salmon *O. nerka*. F: forward primer, R: reverse primer.

Primer	Sequence	Source	Nucleotide position
SNAP25-F	5'-CGTCGTATGCTACAGCTGGT-3'	NM00173949.1	87–106
SNAP25-R	5'-TGTCGATCTGGCGATTCTGG-3'	NM00173949.1	662–681
SNAP25 5'-UTR-F	5'-GCCTCCCAGTAGGATCTATTCTTTC-3'	NM00173949.1	237–261
SNAP25 3'-UTR-R	5'-CATGTTTGCGCCTTGTGACAAA-3'	NM00173949.1	800–821
SNAP25 exon5a-F	5'-CCAAGACATGAAGGAGGCCGAG-3'	This study	—
STX1a-1F	5'-ATCACCCAGCAGGCCATGAAT-3'	XM020485573.1	659–679
STX1a-1R	5'-TTGTGTGTGTGCGCATGTGG-3'	XM020485573.1	992–1011
STX1a-2F	5'-AACCTGACTCGAGAGTACGGA-3'	XM020485573.1	25–46
STX1a-2R	5'-CCACTGAGTGCTCCACGTTGTA-3'	XM020485573.1	803–824
STX1a-3R	5'-TTGTGTGTGCGCGCATGTGG-3'	This study	—
STX1b-1F	5'-AGACAACGAGGCGGAAAAACCC-3'	AY319305.2	57–78
STX1b-1R	5'-AAGCTTGCCACTCTCCAGCA-3'	AY319305.2	614–633
STX1b-2F	5'-AAGACCAAGCAGGAGTTGGAGG-3'	AY319305.2	319–340
STX1b-2R	5'-TGTGGCCGTCTTTCATCGTTGT-3'	AY319305.2	993–1014
VAMP2-F	5'-GGCAACCCACTCAACAGCCA-3'	XM020464331.1	240–259
VAMP2-R	5'-TCTCGTGTGCAGACTGGGGT-3'	XM020464331.1	670–689

解析に用いた。

2-2-4. cDNA クローニング

サケ幼稚魚嗅覚中枢より調製した一本鎖 cDNA を鋳型として RT-PCR を行い、増幅産物を速やかに TA クローニングに供した。RT-PCR 条件は、プレサイクル加熱 94 °C 3 分, 35 サイクルの増幅反応 (熱変性 94 °C 30 秒, アニーリング 61-68 °C 30 秒, 伸長 72 °C 1 分), 伸長反応 72 °C 10 分とし、サーマルサイクラーを用いて行った。各 PCR 反応のアニーリング温度は、後述する。ライゲーションは、pCR II-TOPO ベクター (TOPO TA Cloning Kit; Invitrogen 社) および TOP10 ケミカリーコンピテントセル (Invitrogen 社) を用いて行った。プラスミドの抽出および精製は、一部はプラスミド抽出精製カラム (Pure Yield Plasmid Miniprep System; Promega 社) により行い、アルカリ-ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 法により抽出した粗精製サンプルは、汎用カラム (NucleoSpin gDNA Clean-up; Macherey-Nagel 社) により精製した。精製プラスミド溶液は、NanoDrop 1000 により濃度測定を行った。サケ *snap25* 遺伝子に高等脊椎動物で既知の 2 型アイソフォームが存在することを確認するため、タイセイヨウサケ *snap25a* (NM00173949.1) のエクソン 5 領域を含む 238-682 塩基配列部位に相当する cDNA 断片のクローニングを行った。サケでも存在を確認した両アイソフォームの全翻訳領域 (CDS) の配列を明らかにするため、タイセイヨウサケ *snap25a* (NM00173949.1) 配列の 5'-非翻訳領域 (UTR) からエクソン 5 相当領域を含む 87-681 (SNAP25 5'-UTR-F および SNAP25-R; 設計サイズ 495 bp, アニーリング温度; 61 °C) およびエクソン 5 相当領域から 3'-UTR を含む 237-821 塩基配列部位 (SNAP25-F および SNAP25 3'-UTR-R; 同 469 bp, 66.5 °C) に相当する cDNA 断片のクローニングを行った。サケ *snap25a* の 3'-UTR を含む配列を得るため、先述した 445 bp の *snap25a* 部分配列を参照して作製したフォワード側プライマーを用いてクローニングに用いた (SNAP25 exon 5a-F および SNAP25 3'-UTR-R; 同 485 bp, 68 °C)。他の Snare タンパクの cDNA クローニングは、ギンザケ *stx1a* (XM020485573.1) 659-1011 (STX1a-1F および STX1a-1R; 同 353 bp, 68 °C) および 25-824 (STX1a-2F および STX1a-2R; 800 bp, 65 °C) ニジマス *stx1b* (AY319305.2) 57-633 (STX1b-1F および STX1b-

1R; 同 577 bp, 67 °C) および 319-1014 (STX1b-2F および STX1b-2R; 696 bp, 66.5 °C) ギンザケ *vamp2* (XM020464331.1) 240-689 (VAMP2-F および VAMP2-R; 同 410 bp, 66.5 °C) 塩基配列部位に相当するサケ幼稚魚嗅覚中枢の RT-PCR 産物をクローニングした。

カラフトマスでは、外洋未成熟魚の嗅球由来の cDNA を用いて各 RT-PCR を行い、増幅産物を速やかに TA クローニングに供した。RT-PCR のアニーリング温度は、SNAP25-F および SNAP25-R, 64 °C; STX1a-2F および STX1a-1R, 64.5 °C; STX1b-1F および STX1b-2R, 69 °C; VAMP2-F および VAMP2-R, 66.5 °C の各温度とした。取得したカラフトマス *snare* 遺伝子の塩基配列をもとに、サケで用いた qPCR プライマーの適合性を確認し、定量的発現解析を行った。

サクラマスでは、2⁺ 齢魚の嗅球由来の cDNA を用いて各 RT-PCR を行い、増幅産物を速やかに TA クローニングに供した。RT-PCR のアニーリング温度は、SNAP25-F および SNAP25-R, 64 °C; STX1a-2F および STX1a-3R, 66 °C; STX1b-1F および STX1b-2R, 69 °C; VAMP2-F および VAMP2-R, 66.5 °C の各温度とした。

ヒメマスでは、*snap25a*, *snap25b* および *vamp2* の RT-PCR には 2⁺ 齢魚の嗅球由来、*stx1a* および *stx1b* の RT-PCR には同終脳由来の cDNA を用いて各 RT-PCR を行い、増幅産物を速やかに TA クローニングに供した。RT-PCR のアニーリング温度は、SNAP25-F および SNAP25-R, 64 °C; STX1a-2F および STX1a-3R, 66 °C; STX1b-1F および STX1b-2R, 69 °C; VAMP2-F および VAMP2-R, 66.5 °C の各温度とした。

2-2-5. 塩基配列解析

シーケンシングは、DNA シーケンサー (PRISM 3730 DNA analyzer; Applied Biosystems 社) および BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems 社) を用いて行った。シーケンシングのプロトコルは、RapidSeq POP7 v3 および 3130KB POP7 v3 にて行った。取得した配列情報の解析には、Sequence Scanner 2 (Applied Biosystems 社), ApE (A plasmid Editor v2.0.47) および MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis v10) を用い、NCBI の遺伝子情報データベースを参照した。アミノ酸配列の系統解析では、マルチプルアラインメントは MEGA に内蔵されている ClustalW

により行い、系統樹は近隣結合 (N-J) 法により作成した。

演繹アミノ酸配列の相同性解析および分子系統解析には、以下に記載する脊椎動物および無脊椎動物の SNARES/Snare 複合体構成分子のアミノ酸配列を用いた。Snap25s には、ゼブラフィッシュ (Zebrafish) Snap25a (XP005160680.1) および Snap25b (NP571509.1), ヤマトシビレエイ属魚類 (Ray; *Torpedo marmorata*) Snap25 (AAA49284.1), アフリカツメガエル (Clawed frog; *Xenopus laevis*) Snap25a (AAO13788.1) および Snap25b (AAO13789.1), ニワトリ (Chicken) SNAP25a (AAA49070.1) および SNAP25b (AAA49071.1), ヒト (Human; *Homo sapiens*) SNAP25a (AAC37545.1) および SNAP25b (AAC37546.1), およびショウジョウバエ (Fruit fly; *Drosophila melanogaster*) Snap25 (AAA16059.1)。Stx1s には、タイセイヨウサケ (Atlantic salmon) Stx1a (XP013992684.1) および Stx1b (NP001134494.1), ノーザンパイク (Northern pike; *Esox lucius*) Stx1a (XP010869221.1) および Stx1b (XP012991461.1), アフリカツメガエル Stx1a (XP018101671.1) および Stx1b (XP018095751.1), マウス (Mouse) STX1a (AAH47133.1) および STX1b (NP077725.1), ヒト STX1a (NP004594.1) および STX1b (XP016878382.1) およびショウジョウバエ Stx1 (NP524475.1)。Vamp2 には、ニジマス Vamp2 (XP021474210.1 および XP021417730.1), カワカマス Vamp2 (XP010892931.1 および XP010895165.1), タイセイヨウニシン (Atlantic herring, *Carassius auratus*) Vamp2 (XP031442209.1 および XP031432277.1), ゼブラフィッシュ Vamp2 (NP956299.1), イエローパーチ (Yellow perch; *Perca flavescens*) Vamp2 (XP028454053.1), トラフグ (Pufferfish; *Takifugu rubripes*) Vamp2 (XP011609760.2), アフリカツメガエル Vamp2 (NP001080944.1), ニワトリ VAMP2 (XP015132540.1), マウス VAMP2 (NP033523.1), ヒト VAMP2 (NP055047.2)。

2-3. 結果

2-3-1. サケ嗅覚中枢における snare/Snare 分子

サケ幼稚魚嗅覚中枢を用いた cDNA クローニングにより, サケ *snap25a*, *snap25b*, *stx1a*, *stx1b* および *vamp2* (以下, *snare* 3 分子) 翻訳領域全長の塩基配列を得て, その配列を国立遺伝学研究所の塩基配列データベース (GenBank) に登録し, それ

ぞれ *snap25a*: LC315096, *snap25b*: LC315097, *stx1a*: LC414366, *stx1b*: LC414367, *vamp2*: LC414368 および LC414369 のアクセッション番号を得た。

snap25a については、タイセイヨウサケ *snap25a* (NM00173949.1) のエクソン 5 相当領域を含む部位 (SNAP25-F と SNAP25-R; 445 bp), 5'-非翻訳領域 (UTR) からエクソン 5 相当領域を含む部位 (SNAP25 5'-UTR-F と SNAP25-R; 495 bp), エクソン 5 相当領域から 3'-UTR を含む部位 (SNAP25-F と SNAP25 3'-UTR-R; 469 bp) および CDS 内の部分配列に基づいて作製した特異プライマーを用いた 3'-UTR を含む部位 (SNAP25 exon 5a-F と SNAP25 3'-UTR-R; 485 bp) の計 4 種の cDNA 断片の配列情報から全翻訳領域 (全 CDS) 配列を得た。明らかになったサケ *snap25* の全 CDS 配列 (688 bp) には, 高等脊椎動物 *SNAP25a/Snap25a* と相同性の高い *snap25a* および *SNAP25b/Snap25b* と相同性が高い *snap25b* の 2 型が存在した。それらサケ *Snap25* では, 互いの演繹アミノ酸配列に 15/206 アミノ残基の変異があり, アミノ酸配列相同性は 92.7%だった。また, そのエクソン 5 相当領域は, 脊椎動物で共通なシステインリッチドメインのアミノ酸配列のアイソフォーム間変異が保存されていた (Fig. 4)。本研究で得られたクローンは, エクソン 5 相当領域にアイソフォーム間の変異が集中しており, 688 bp の塩基配列に含まれる 5'-および 3'-UTR 側の非翻訳領域でも相同性が高く, スプライシングバリエーションの特徴を示していた。サケ類の *Snap25s* は, 哺乳類 *SNAP25a* と近縁であった魚類 *Snap25s* のクラスターに含まれた (Fig. 5)。

サケの嗅覚中枢より, 魚類 *stx1a* および高等脊椎動物 *STX1a/Stx1a* と高い相同性を示し, 3'-UTR を含むサケ *stx1a* 遺伝子断片を得た (STX1a-1F および STX1a-1R; 353 bp)。同様に 5'-UTR を含む遺伝子断片を得た (STX1a-2F および STX1a-2R; 800 bp)。サケの嗅覚中枢より, 魚類 *stx1b* および高等脊椎動物 *STX1b/Stx1b* と高い相同性を示し, 5'-UTR を含むサケ *stx1b* 遺伝子断片を得た (STX1b-1F および STX1b-1R; 577 bp)。同様に 3'-UTR を含むサケ *stx1b* 遺伝子断片を得た (STX1b-2F および STX1b-2R; 696 bp)。これら 4 つの配列情報から明らかになったサケ *stx1a* および *stx1b* の CDS 塩基配列 (945 bp および 911 bp) は, 互いの演繹アミノ酸配列に 53/911 アミノ残基の変異があり, アミノ酸配列相同性は 94.2%だった (Figs. 6, 7)。サケ *stx1a* および *stx1b* の 5'-および 3'-UTR は互いに変異が多く (Fig. 7),

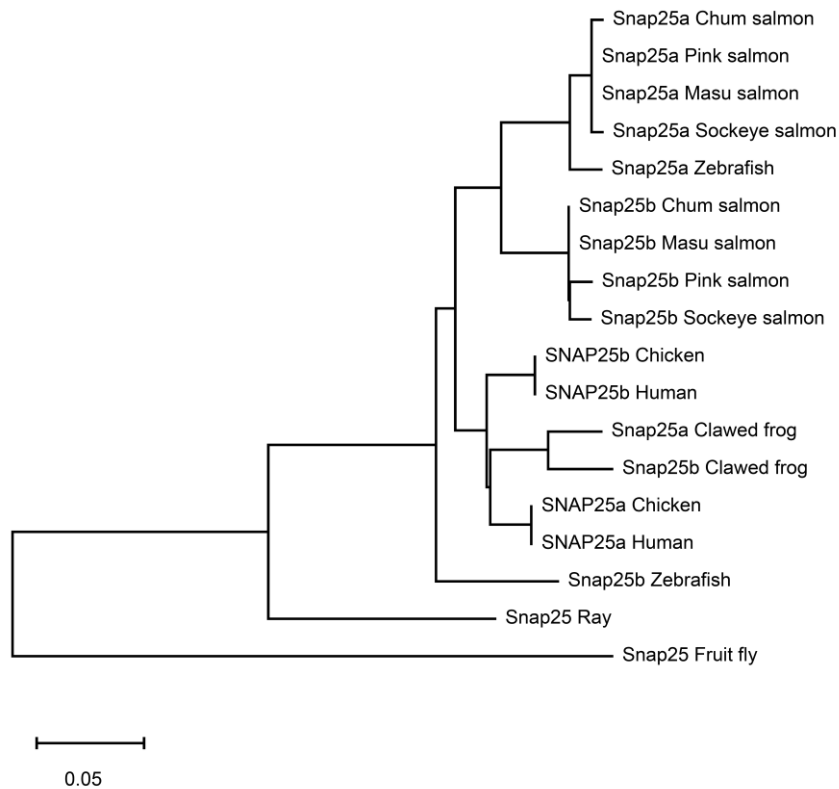


Fig. 5. Phylogenetic tree of known synaptosome-associated protein 25 s (Snap25s) constructed using the neighbour-joining method. Amino acid sequences of SNAP25a/Snap25a and SNAP25b/Snap25b were compared between salmon and other vertebrates. The scale bar shows residue substitutions per site in the sequence. Sequence information on the SNAP25s/Snap25s of other vertebrates is shown in section 2-2-5.

同演繹アミノ酸配列の系統解析では互いに異なるクレードに分類された (Fig. 8)。

サケの嗅覚中枢より、5'-UTR および 3'-UTR の一部を含むサケ *vamp2* の全 CDS 配列 (410 bp) を得た。111 アミノ残基からなる演繹アミノ酸配列には、SNARE 結合にヘリックスを供給する R-SNARE モチーフが保存されており (24-86 アミノ酸配列部位)、膜貫通領域に 1 アミノ残基変異 (104 アミノ酸配列部位: イソロイシンとトレオニン) が生じているサケ Vamp2 の 2 型サブタイプが得られた (Fig. 9)。サケ *vamp2* subtype1 は、サケ類の *vamp2* subtype1 (ギンザケ; XM020464331.1, ニジマス; XM021618535.1) と 100% 相同であり、サケの subtype2 は、同 subtype2 (ギンザケ; XM020466331.1, ニジマス; XM021591152.1) と高い相同性を示した。他の真骨魚類でも、カワカマス Vamp2 (XP010892931.1, XP010895165.1, 110 および 120 アミノ残基)、タイセイヨウニシン Vamp2 (XP031442209.1, XP031432277.1, 115 および 118 アミノ残基) で長短の 2 型サブタイプが存在したが、そのアミノ酸配列長はサケ類の両サブタイプよりもさらに長かった。他の真骨魚類における長短の Vamp2 サブタイプ間では、N-末端および C-末端側に変異が多く、種間およびサブタイプ間で SNARE モチーフが保存されており、アミノ酸配列長の差は N-末端側の変異によるものであった (Fig. 9)。高等脊椎動物 VAMP2 も、アミノ酸配列長が ≥ 115 アミノ残基であり、アミノ酸配列の系統解析においてサケ類 Vamp2 はサイズが近いカワカマス Vamp2 (XP010892931.1) の下位クレードに位置し、真骨魚類 Vamp2 はアミノ酸配列長ごとにクレードを形成した (Fig. 10)。

2-3-2. カラフトマス嗅覚中枢における *snare*/Snare 分子

カラフトマスでは、*snare* 3 分子の翻訳領域全長の塩基配列が得られた。具体的には、サケ *snap25a* および *snap25b* の 1-688 塩基配列部位に相当するカラフトマス *snap25a* (LC514679, 688 bp) および *snap25b* (LC514680, 688 bp) の塩基配列が得られた。同様にサケ *stx1a* の 1-945 塩基配列部位に相当する 3 型のカラフトマス *stx1a* (LC514681, LC514682 および LC514683, 945 bp) 塩基配列、サケ *stx1b* の 1-911 塩基配列部位に相当する 2 型のカラフトマス *stx1b* (LC514684 および LC514685, 911 bp) 塩基配列およびサケ *vamp2* の 1-410 塩基配列部位に相当するカラフトマス *vamp2* (LC514686, 410 bp) 塩基配列を得た。サケ Stx1a および Stx1b 演繹アミノ

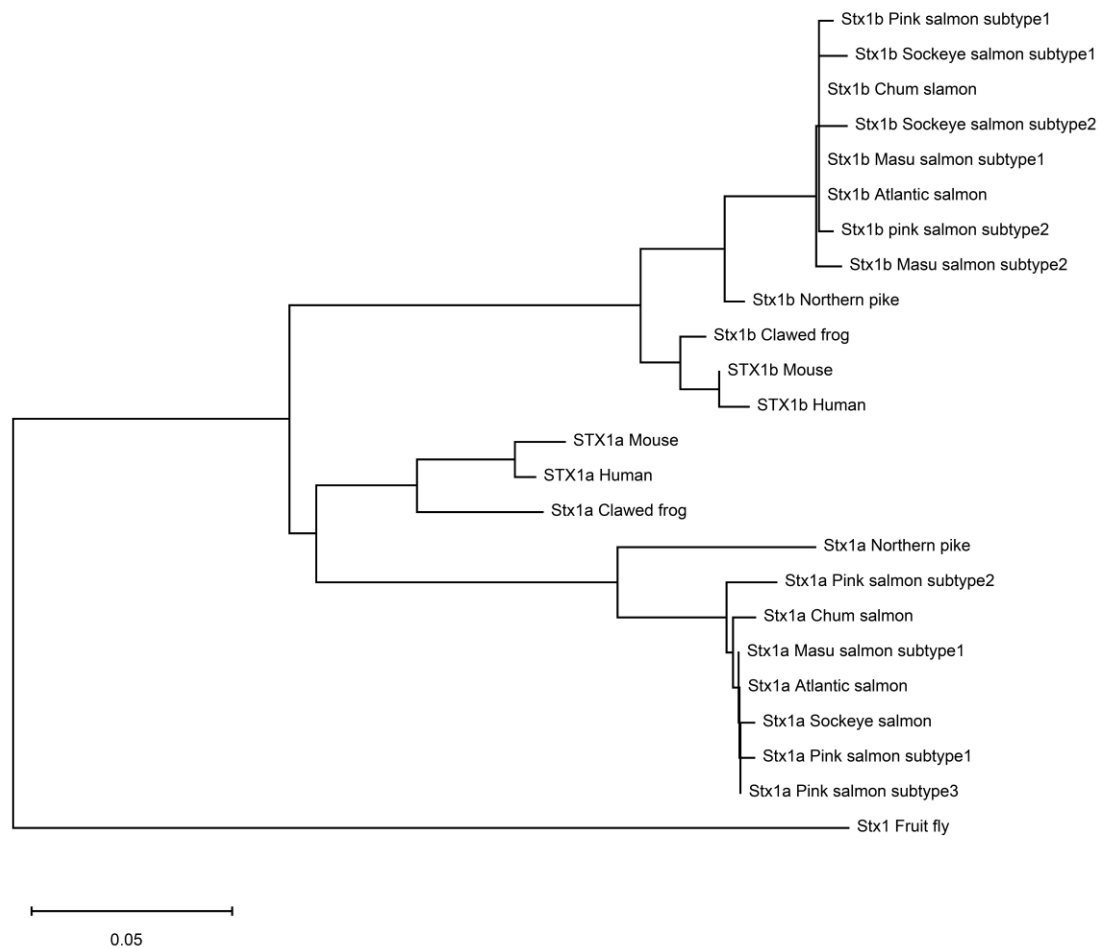


Fig. 8. Phylogenetic tree of known syntaxin isoform 1 s (Stx1s) constructed using the neighbour-joining method. Amino acid sequences of Stx1s were compared between salmon and other vertebrates. The scale bar shows residue substitutions per site in the sequence. Sequence information on the STX1s/Stx1s of other vertebrates is shown in section 2-2-5.

				R-SNARE motif
Vamp2 Chum salmon subtype1	MSAPAAAGAPADGA	APPPNLTSNR	RLQQTQAQVDEVVDI	
Vamp2 Chum salmon subtype2				
Vamp2 Pink salmon				
Vamp2 Masu salmon subtype1				
Vamp2 Masu salmon subtype2				
Vamp2 Sockeye salmon				
Vamp2 Rainbow trout				
Vamp2 Raibow trout	..TTD..T.GAP	EGEGGPP..A..		
Vamp2 Northern pike	E..			
Vamp2 Northern pike	..T.D..T.GAPGAP	EGDGGPA..A..		
Vamp2 Atlantic herring	D..T.GAP	GAEGEAGG.....		
Vamp2 Atlantic herring	SDA..GAD	GGPGGAP.....T..		
Vamp2 Zebrafish	G.P..EG.N	QA.....		
Vamp2 Yellow perch	..T.E..S.GGP	DGEGGPP..A..		
Vamp2 Japanese pufferfish	TG..EG..P	QQ.....		
Vamp2 Clawed frog	GPPA.APG	DGAPQG.....		
VAMP2 Chicken	MQASLR....PTQG.TSTG	AAGPP.AT.VS..K		
VAMP2 Mouse	T..TVP..AP.G	EGGPP.....		
VAMP2 Human	T..TAP..AP.G	EGGPP.....		
R-SNARE motif	MRVNVDKVLERDQKLSELDDRADALQAGASQFETSAAKLKNKYWWKN	AKMMIILGLICAIVLIVIVYFST		
		T.....		
				
	T.....T.....			
				
	R.....S.....	L.....MAI.GV.CVG.VFL..YY		
		I.....		
	R.....S.....	L.....MAI.GV.CVG.LFL..FY		
	S.....	M.....M.I.GI.LMG.LFM..YY		
	SC.....	C.....M.V.GV.LVG.I.CLH.FS		
	V.....V.....	V.....I.....		
	S.....	C.....MAV.GV.CCG..FL..FY		
		V.....V.....		
	T.....	M.....M.V.....I.....		
..M.....N.....	R.....	C.....VV.TVI..I..I.....		
.....	R.....	L.....V.....I.....		
.....	R.....	L.....V.....I.....		

Fig. 9. Alignment of deduced amino acid sequences of vesicle-associated membrane protein 2 (Vamp2) of chum salmon, *Oncorhynchus keta*, pink salmon, *O. gorbuscha*, masu salmon, *O. masou*, sockeye salmon, *O. nerka*, and other vertebrates. Dots correspond to residues identical to chum salmon Vamp2 subtype 1 (LC414368). The box indicates the R-soluble N- ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor (R-SNARE/Snare) motif (position 24–86).



Fig. 10. Phylogenetic tree of known vesicle-associated membrane protein 2 s (Vamp2s) constructed using the neighbour-joining method. Amino acid sequences of Vamp2 were compared between salmon and other vertebrates. The scale bar shows residue substitutions per site in the sequence. Sequence information on the VAMP2/Vamp2 of other vertebrates is shown in section 2-2-5.

酸配列およびサケ，カラフトマス，マウスおよびヒト *stx1a/Stx1a/STX1a* および *stx1b/Stx1b/STX1b* 塩基配列のアラインメントを上述の Fig. 7 に示した。

2-3-3. サクラマス嗅覚中枢における *snare/Snare* 分子

サクラマスでは，*snare* 3 分子の翻訳領域全長の塩基配列が得られた。具体的には，サケ *snap25a* およびサケ *snap25b* の 1-688 塩基配列部位に相当するサクラマス *snap25a* (アクセッション番号: 登録申請中, 688 bp) および *snap25b* (登録申請中, 688 bp) 塩基配列が得られた。サケ *stx1a* の 1-945 塩基配列部位に相当する 2 塩基の非同義置換を示す 2 型のサクラマス *stx1a* (登録申請中, 945 bp) 塩基配列および 2 型のサケ *stx1b* の 1-911 塩基配列部位に相当するサクラマス *stx1b* (登録申請中, 911 bp) 塩基配列を得た。サケ *vamp2* の 1-410 塩基配列部位に相当するサクラマス *vamp2* (登録申請中) 塩基配列を得た。

2-3-4. ヒメマス嗅覚中枢における *snare/Snare* 分子

ヒメマスでも，*snare* 3 分子の翻訳領域全長の塩基配列が得られた。具体的には，サケ *snap25a* および *snap25b* の 1-688 塩基配列部位に相当するヒメマス *snap25a* (登録申請中, 688 bp) および *snap25b* (アクセッション番号: 登録申請中, 688 bp) 塩基配列を得た。ヒメマス終脳よりサケ *stx1a* の 1-945 塩基配列部位に相当するヒメマス *stx1a* (登録申請中, 945 bp) 塩基配列およびサケ *stx1b* の 1-908 塩基配列部位に相当するヒメマス *stx1b* (登録申請中, 908 bp) 塩基配列を得た。ヒメマス嗅球よりサケ *vamp2* の 1-410 塩基配列部位に相当するヒメマス *vamp2* (登録申請中, 410 bp) 塩基配列を得た。

2-3-5. サケ類 *snare/Snare* 分子の種間比較

本研究で得られたサケ類 *snare* 遺伝子の塩基配列を，サケと比較した相同性を以下に示す。サケ *snap25a* 塩基配列は，カラフトマス，サクラマスおよびヒメマス *snap25a* とそれぞれ 99.6, 99.4-99.6 および 99.6%の相同性を示した。サケ *snap25b* とカラフトマス，サクラマスおよびヒメマス *snap25b* は，99.3, 99.6 および 99.4%の相同性を示した (Fig. 4)。 *snap25a* および *snap25b* の 2 型アイソフォーム間の塩

基配列相同性は、サケおよびカラフトマスで 94.9%，サクラマスで 95.2%，ヒメマスで 94.8% だった。サケ *stx1a* 塩基配列とカラフトマス，サクラマスおよびヒメマス *stx1a* は，98-99，98.7 および 99.2% の相同性を示した。サケ *stx1b* とカラフトマス，サクラマスおよびヒメマス *stx1b* は，99.5，99.2-99.8 および 98.5% の相同性を示した (Fig. 6)。サケ *vamp2* 塩基配列とカラフトマス，サクラマスおよびヒメマス *vamp2* は，99-100，99.3 および 99.3% の相同性を示した (Fig. 9)。

2-4. 考察

本研究は，サケ属魚類の脳内に発現する *snare* 3 分子の cDNA クローニングを行った最初の報告であり，ゲノム情報や転写産物断片に基づいた推定では無く，mRNA として発現するサケ類 *snare* 遺伝子の塩基配列を確認した。サケ嗅覚中枢よりクローニングされた *snap25a* および *snap25b* は，共通する 5'-および 3'-UTR 塩基配列断片とエクソン 5 相当領域に集中した変異といった特徴から，高等脊椎動物と同様に選択的スプライシングにより生じたアイソフォーム (Bark 1993, Bark and Wilson 1994) であると考えられた。両アイソフォームは，サケ，カラフトマス，サクラマスおよびヒメマスの種間で高度に保存されていたが (Fig. 4)，わずかながら種内で変異を示したことからサブタイプの存在も示唆された。ゲノム情報を基にした推定ではあるが，タイセイヨウサケの *snap25s* においては，3 種類の predicted *snap25a*: XM014144861.1, XM014144863.1 および NM001173949.1 (相同性 91.5-99.0%) と 4 種類の predicted *snap25b*: XM014211547-50 (相同性 97.0-99.0%) が推定されており，4 倍体以上の多型が存在する可能性がある。また，サケ科魚類では，サケ科魚類特異的ゲノム倍数化 (Leong et al. 2010, Berthelot et al. 2014) に加えて，局所的な遺伝子倍数化 (e.g., Berthelot et al. 2014, Warren et al. 2014) およびその後の単数化 (Kim et al. 2016, Lien et al. 2016) 等の過程で複雑な分子進化が生じている。これらのことから，本研究では存在を明らかにできていないが，サケ類 *snap25s* には少なくとも *snap25a1* と *snap25a2* および *snap25b1* と *snap25b2* の四倍化したサブタイプが存在する可能性がある。

stx1a および *stx1b* は，本研究の 4 種のサケ類より得られた *stx1s* 塩基配列は比較できた塩基配列長はごく短い互いに異なる 5'-および 3'-UTR 配列を有し (Fig.

7), 演繹アミノ酸配列におけるアミノ酸変異も全体的に分布していた。このことから, サケ *stx1s* は *snap25s* のようなスプライシングアイソフォームではなく, 互いに異なる遺伝子座に存在する遺伝子であると推定された。また, サケ類および他の脊椎動物 *Stx1s*/*STX1s* の分子系統解析において, サケ類 *Stx1a* が脊椎動物 *Stx1a*/*STX1a* クレードに, サケ類 *Stx1b* が脊椎動物 *Stx1b*/*STX1b* クレードに含まれたことから (Fig. 8), サケ類 *Stx1s* は高等脊椎動物 *STX1s*/*Stx1s* と同様の分子進化過程を経ていると考えられた。サケ類 *Stx1a* および *Stx1b* 演繹アミノ酸配列は, 他の SNARE 分子との結合に機能する SNARE モチーフである H3 ドメイン (Sutton et al. 1998, Lin and Scheller 2000) および *STX1* 閉構造に関連する N-末端ドメイン (Misura et al. 2000, Burkhardt et al. 2008) が高等脊椎動物と比較して高度に保存されており, 機能的な *Stx1a* および *Stx1b* であると考えられた。

vamp2 は, サケ *Vamp2* が種内でアミノ酸置換を伴う変異を示したことから, サケ類で 2 種類以上のサブタイプの存在が示唆された。本研究で得られたサケ類 *Vamp2* 演繹アミノ酸配列は 111 アミノ残基であったが, ゲノム配列に基づいて, ギンザケ *Vamp2* (XP020356123.1, 115 アミノ残基), タイセイヨウサケ *Vamp2* (XP013997672.1, 115 アミノ残基) およびカワカマス *Vamp2* (XP010895165.1, 118 アミノ残基) のようにサケ科魚類と近縁種において「長い」*VAMP2* タイプの存在が推定されている。しかし, 本研究ではサケ類嗅覚中枢において ≥ 115 アミノ残基の *Vamp2* をコードする遺伝子の存在は明らかにできていない。真骨魚類 *Vamp2* にはアミノ酸配列長が異なる 2 型サブタイプが存在し, その長さも種間で変異が生じていた。しかし, SNARE モチーフは魚類と高等脊椎動物の間で保存されており, 両サブタイプは機能的であると考えられるが, 魚類において両サブタイプの発現を比較した報告は無いことから, どちらが主要なサケ類 *vamp2* サブタイプであるかは不明であった。

第3章 嗅覚器官および脳における *snare* 遺伝子の発現解析

3-1. 背景と目的

第2章においてサケ類嗅覚中枢における *snare* 遺伝子の発現が確認された。サケ類 Snare タンパクの一次構造は、高等脊椎動物と比較して高度に保存されていたことから、これらの分子はサケ類でも高等脊椎動物と同様の機能を担うと考えられた。しかしながら、嗅神経系を含む脳各部位での発現動態については全く不明であり、発現している脳領域や細胞種についても分かっていない。げっ歯類では、*Snap25s* 発現脳部位がアイソフォーム特異的であり (Boschert et al. 1996, Johansson et al. 2008), マウス嗅球では、SNAP25a は SNAP25b に比べてタンパク発現強度が強い (Yamamori et al. 2011)。STX1a は、げっ歯類中枢神経系においてグルタミン酸興奮性および γ -アミノ酪酸抑制性シナプスにおけるシナプス小胞放出プールの構成に機能しているが (Fujiwara et al. 2006, Mishima et al. 2014), 速い開口放出には STX1b がより重要であるとされている (Arancillo et al. 2013, Kofuji et al. 2014, Mishima et al. 2014)。ショウジョウバエ視葉では、ニューロンの間隙に生じるニューロピルの形成に *vamp2* 発現上昇が関与している (Hiesinger et al. 1999)。また、VAMP2 と SNAP25 はシナプス小胞のリサイクリングにも機能する (Zhang et al. 2013)。これらのことから、サケ類においても偽遺伝子ではない機能的な Snare 複合体を構成する分子は、同じ脳領域の同じ細胞種に発現すると考えられる。また、その発現脳領域から嗅覚情報の伝達との関連を示し、魚類脳における高等脊椎動物との機能的相同領域を元に特定の神経活動との関連を類推することが可能である。そこで本章では、サケ嗅覚器官と脳各部位における *snare* 遺伝子発現状況を明らかにすることを目的とした。

3-2. 材料と方法

3-2-1. 供試魚

サケ (シロザケ) 幼稚魚脳における *snare* 遺伝子の発現解析には、北海道南西部八雲町遊楽部川本流の中・下流域において電撃漁具 (エレクトロフィッシャー LR-24; Smith Root 社) を用いて採集した降河中幼稚魚を本学部先端環境制御実験

棟恒温飼育室 (10℃) にて人工海水 (Tetra Marin Salt Pro; Tetra 社) で育成した個体を用いた。嗅覚器官とより詳細に部位を区分した脳各部位 (Fig.11) における *snare* 遺伝子の発現解析には、遊楽部川水系の上流域の支流セイヨウベツ川において電撃漁具で採集した産卵遡上後の成熟雄を用いた。炭酸ガス水により不動化・魚体測定の後、幼稚魚からは、嗅覚前部 (嗅球および終脳の嗅覚中枢)、脳中部 (視蓋と視床および視床下部) および脳後部 (小脳および延髄) を剖出した。親魚からは嗅覚器官 (嗅房および嗅神経束)、脳各部位 (嗅球、終脳、視蓋、視床+視床下部、小脳および延髄) および脳下垂体を剖出した。得られた組織は RNA 保護保存液中に 4℃ で一晩浸漬し、-30℃ で冷凍保存した。*snare* 遺伝子の分子組織化学的解析に用いた供試魚は、2017~2020 年春季に遊楽部川中・下流域で電撃漁具を用いて採集したサケ幼稚魚を用いた。炭酸ガス水により不動化・魚体測定の後、断頭した頭部を冷 0.1 mol/L リン酸緩衝 4%パラフォルムアルデヒド液 (pH 7.2; PFA) で固定し、解析まで 4℃ にて 70%エタノール中に保管した。

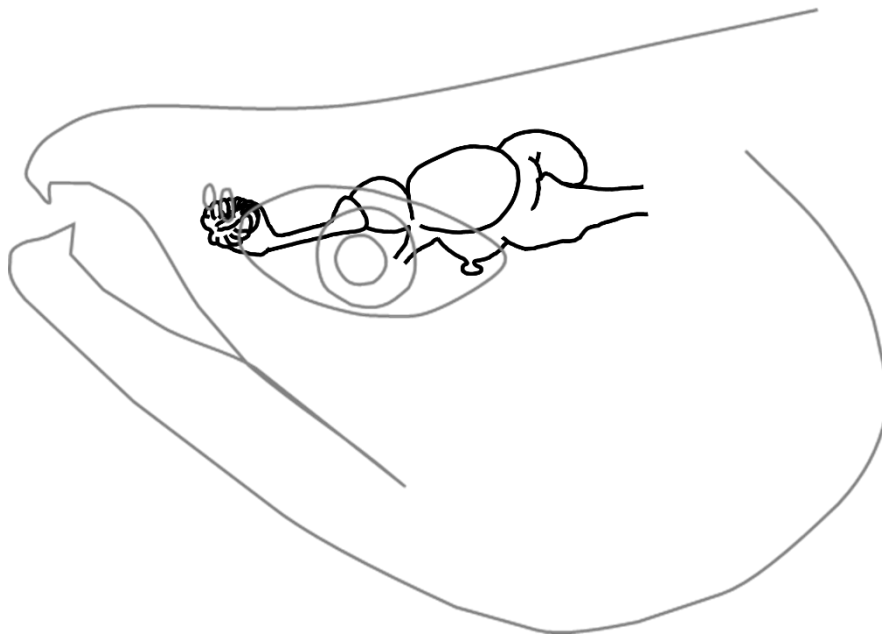
3-2-2. 定量的発現解析

嗅覚器官、脳各部位および脳下垂体組織からの全 RNA 抽出およびその精製は、2-1-1 と同様に行った。全 RNA サンプルの濃度を、NanoDrop 1000 により測定した。各組織より抽出した全 RNA を鋳型として、前述の反応条件で cDNA を合成した。*snare* 遺伝子 (*snap25a*, *snap25b*, *stx1a*, *stx1b* および *vamp2*) の発現解析には、リアルタイム定量 PCR (qPCR) の増幅領域を含む遺伝子断片をサブクローニングしたプラスミドを調製し、段階希釈によるプラスミドスタンダードを用いた絶対定量により行った。プラスミド DNA のコピー数は、Lee et al. (2006) を参照し、改変を加えた以下の式により算出した。

$$\text{Copies} = (6.02 \times 10^{23}) \times \frac{(\text{DNA volume})}{(\text{DNA length}) \times 660}$$

プラスミド DNA のコピー数 (copies) は、1 mol あたりのコピー数 (copy/mol) としてアボガドロ数 (6.02×10^{23}) を用い、反応系内の DNA のモル量 (mol) との積で示した。DNA のモル量は、サンプル DNA 量 (DNA volume [g]) をプラスミ

A



B

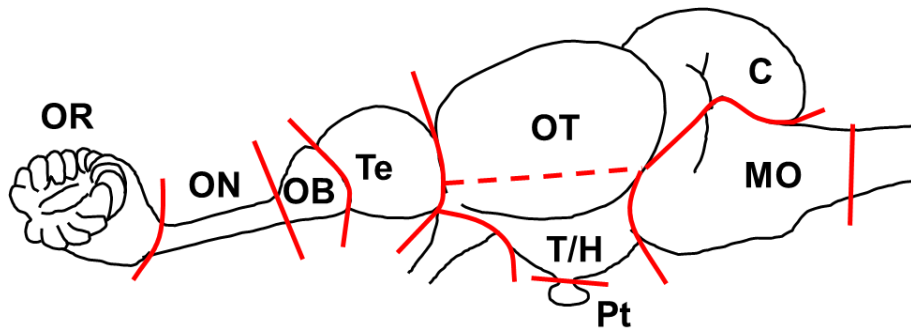


Fig. 11. Schematic illustration of salmon head and brain. A: Lateral view of salmon head and the position of brain. B: Lateral view of salmon brain and diagrams of regions, C: cerebellum, MO: medulla oblongata, OB: olfactory bulb, ON: olfactory nerve, OR: olfactory rosette, OT: optic tectum, Pt: pituitary, Te: telencephalon, T/H: thalamus and hypothalamus.

ド DNA の 1 mol あたりの質量 (g/mol) で除した値とし、サンプル DNA 量は、精製プラスミド溶液濃度 (ng/μl) とアプライ量 (μl) から算出した。プラスミド DNA の 1 mol あたりの質量は、DNA 長 (DNA length [bp]) と二本鎖 DNA の平均分子量 (660 [g/mol/bp]) の積とし、DNA 長は、インサート DNA (PCR 産物) とプラスミドベクター (TOPO vector; 3,973 [bp]) の塩基長の和とした。プラスミド溶液は、 10^{-2} - 10^{-6} に段階希釈してコピー数既知のスタンダードとした。qPCR には、FastStart Essential DNA Green Master Mix および Light Cycler Nano (Roche 社) を用いた。qPCR の反応条件は、プレサイクル加熱 95 °C 10 分、45 サイクルの増幅反応 (熱変性 95 °C 30 秒、アニーリング 30 秒、伸長 72 °C 1 分)、融解曲線分析 60-97 °C (+0.1 °C/秒) とした。アニーリング温度は、*snap25a*, *snap25b* および *stx1b* は 65 °C, *stx1a* と *vamp2* は 66 °C とした。qPCR に用いるプライマーは、2-1-1 の cDNA クローニングにより得られたサケおよびカラフトマス *snare* 遺伝子の塩基配列および他の魚類の配列情報を参照し、Primer 3 Plus および Multiple Primer Analyzer を利用して設計した (Table 2)。qPCR は、各サンプルを duplicate して行い、プレート間の値は各分子のプラスミド希釈溶液をキャリブレータとして補正した。各サンプルの発現量は、プラスミドスタンダードの測定で得られた蛍光検出閾値 (Cq 値) - コピー数 (copies) の検量線によってサンプル Cq 値からコピー数を算出し、組織量が異なるサンプル間での比較のため全 RNA 量あたりコピー数 (copies/RNA [ng]) で示した。qPCR 実験に関する情報の記載には、qPCR 実験結果の公表に関するガイドライン (MIQE; Bustin et al. 2009) を参照した。

3-2-3. 統計解析

定量的発現解析により得られた発現量は、平均値 ± 標準誤差 (SE) で示した。統計解析は、SPSS 20.0 (IBM 社) を用いて行い、有意水準は $p < 0.05$ とした。各データは、Shapiro-Wilk 検定により分布の正規性を確認した。比較する全データが正規分布と有意に異ならなかった場合は、一元配置分散分析 (ANOVA) の後、Tukey honestly significant difference (HSD) 検定により多重比較を行った。正規分布に従わないデータが含まれた場合は、Kruskal-Wallis 検定の後に Dunn 検定により多重比較を行った。

Table 2. Primer sets used in real-time PCR of chum salmon, *Oncorhynchus keta*, for synaptosome-associated protein 25 isoform-a (*snap25a*) and isoform-b (*snap25b*), syntaxin isoform-1a (*stx1a*) and isoform-1b (*stx1b*), and vesicle-associated membrane protein isoform-2 (*vamp2*). Beginning small letter “s” means “salmon” in each primer name. F: forward primer, R: reverse primer.

Primer	Sequence	Source
sSNAP25a-F	5'-ACTGGATCGTGTTGAAGATGGC-3'	This study
sSNAP25b-F	5'-CTGTGGTCTTTGCTCCTGTCCT-3'	This study
sSNAP25ab-R	5'-TCCTCCACTGATGGCCATCTGT-3'	This study
sSTX1a-F	5'-TGTTTCATGGACATGGCCATGCT-3'	This study
sSTX1a-R	5'-CACTGCCTTCTTGGTGTCAGACA-3'	This study
sSTX1b-F	5'-AGCAATCGAGCAGAGCATTGAG-3'	This study
sSTX1b-R	5'-TTTGGACTGCGTGGTGTTGTAC-3'	This study
sVAMP2-F	5'-AGACACAGGCTCAGGTGGATGA-3'	This study
sVAMP2-R	5'-CACTGGTCTCGAACTGTGAGGC-3'	This study

3-2-4. *in situ* ハイブリダイゼーション

snare 遺伝子 (*snap25a*: 445 bp, *stx1b*: 536 bp および *vamp2*: 410bp) の増幅領域を含む遺伝子断片をサブクローニングした pCRII-TOPO プラスミドベクター (Invitrogen 社) を制限酵素 *Bam*H I または *Xho* I (Roche 社) により直鎖化した。直鎖化した DNA を鋳型として、Digoxigenin (DIG) RNA Labeling Mix, SP6 および T7 ポリメラーゼ (Roche 社) を用いてセンス鎖およびアンチセンス鎖の DIG 標識サケ *snap25*, *stx1* および *vamp2* cRNA プローブをそれぞれ作製した。

分子組織化学的解析用固定試料を常法によりパラフィン (Histosec; Merck 社) に包埋し、回転式マイクロトーム (M1512; ライツ社) により約 5 μ m 厚の連続切片を作製した。脱パラフィンおよび再水和の後、切片をプロテナーゼ K (20 mg/L proteinase K in 10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA [pH 8.0]) により 37 °C 20 分の処理を行い、4%PFA による再固定、0.2 N 塩酸処理、アセチル化 (2.5% acetic-anhydride in 0.1 mol/L triethanolamine-HCl [pH 8.0]) をそれぞれ 10 分施行した。ハイブリダイゼーションバッファー (1×Denhardt's solution [0.2 g/L Ficoll, 0.2 g/L polyvinylpyrrolidone, 0.2 g/L bovine serum albumin], 10 mmol/L Tris-HCl [pH 7.6], 1 mmol/L EDTA, 2.5 g/L SDS, 5 mol/L NaCl, 200 mg/L yeast transfer RNA, 100 mg/L calf thymus DNA) で室温 1 時間のプレハイブリダイズを行った後、硫酸デキストランを 5%量になるように添加した上記ハイブリダイゼーションバッファーによりプローブを 50 倍に希釈し、パラフィルムで切片表面を覆った後、50%ホルムアミド水溶液で湿らせた湿箱内で 50 °C 一晚のハイブリダイズを行った。ハイブリダイズ後、50 °C の 5×SSC (1×SSC: 150 mmol/L NaCl, 15 mmol/L sodium citrate) でパラフィルムを剥がし、プローブ洗浄 (50% formamide in 2×SSC, 20 分×2 回) および RNase A G.S. (ニッポンジーン社) による一本鎖状態のプローブの消化を行った後、アルカリフォスファターゼ標識 DIG 抗体 (Anti-digoxigenin-AP, Fab fragments: Roche 社) を 500 倍に希釈し、室温 2 時間でインキュベーションした。洗浄後、BCIP-NBT キット (ナカライテスク社) により発色させ、アクアテックス (Merck 社) で封入し、生物顕微鏡 (ECLIPSE 80i; ニコン社) にて *snap25*, *stx1* および *vamp2* mRNA 発現シグナルの観察および写真撮影を行った。

3-3. 結果

3-3-1. サケ幼稚魚の *snare* 遺伝子発現部位

降海後幼稚魚の *snap25a* 発現は、嗅覚中枢の脳前部で脳後部に比べて有意に高かった (Fig. 12A)。*snap25b* 発現は、脳後部で脳前部に比べて有意に高かった (Fig. 12B)。*stx1a* と *stx1b* 発現は、脳中部で最も高かったが、発現量に有意差は無かった。脳後部における *stx1a* 発現は、嗅覚中枢に比べ有意に高かった (Fig. 12C, D)。*vamp2* 発現は、嗅覚中枢で脳後部に比べ有意に高かった (Fig. 12E)。

3-3-2. サケ成熟魚の *snare* 遺伝子発現部位

成熟魚での *snap25a* 発現は、脳全体に発現し、嗅球と終脳で、他の部位に比べて有意に高かった (Fig. 13A)。同 *snap25b* も同様に脳全体に発現し、終脳で最も高く、嗅房、嗅神経および脳下垂体に比べて有意に高かった (Fig. 13B)。同 *stx1a* 発現は、終脳で最も高く、嗅球および終脳での発現は視床+視床下部を除く他の部位に比べて有意に高く、視床+視床下部での *stx1a* 発現も、嗅房、嗅神経および脳下垂体と比べ有意に高かった (Fig. 13C)。同 *stx1b* 発現は、終脳で最も高く、嗅房、嗅神経および脳下垂体と比べて有意に高かった (Fig. 13D)。同 *vamp2* 発現は、嗅球で最も高く、終脳、延髄、嗅房および嗅神経に比べて有意に高く、終脳でも嗅房と嗅神経に比べて高かった (Fig. 13E)。両 *snap25* については、成熟雌でも解析したが顕著な雌雄差は認められなかった (data not shown)。

3-3-3. サケ幼稚魚脳の *snare* 遺伝子発現細胞

降海期サケ幼稚魚の嗅球、終脳および間脳における *snap25*, *stx1* および *vamp* 発現の *in situ* ハイブリダイゼーション像を Figs. 14-17 に示す。アンチセンス鎖標識プローブを用いた反応において、*snap25* 発現を示す特異的シグナルが脳各部位の神経細胞核周辺部に観察された (Figs. 14A, 15A, C, E, G)。また、センス鎖標識プローブを用いた反応では特異的シグナルは認められなかった (Fig. 14D)。*snap25* 発現は、嗅球顆粒細胞 (GR) 層および同僧帽細胞 (Figs. 14A, 15A), 終脳背側背側 (Dd), 同背側外側背部 (Dld), 同背側外側腹部 (Dlv), 同背側中央 (Dc), 同背側内側 (Dm), 同腹側背側 (Vd) および同腹側腹側 (Vv) で検出された (Figs. 15C, E,

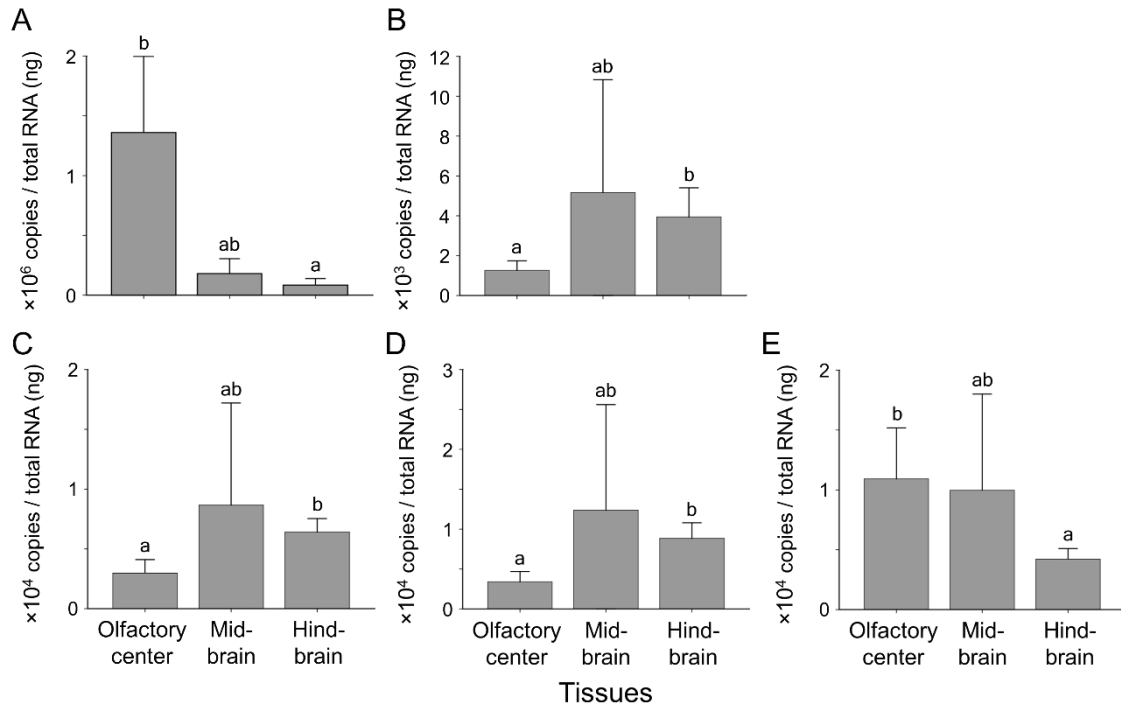


Fig. 12. Expression analyses of synaptosome-associated protein isoform 25a (*snap25a*: A) and isoform 25b (*snap25b*: B), syntaxin isoform-1a (*stx1a*: C) and isoform-1b (*stx1b*: D), and vesicle-associated membrane protein isoform-2 (*vamp2*: E) in the Olfactory center (mixture of olfactory bulb and telencephalon), Mid-brain (mixture of optic tectum, thalamus, and hypothalamus), and Hind-brain (mixture of cerebellum and medulla oblongata) in juvenile chum salmon using quantitative real-time PCR (qPCR). Values represent the mean $\pm$ standard error (n=5-7) of copies per sample RNA (ng). Shared letters indicate no significant difference ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test).

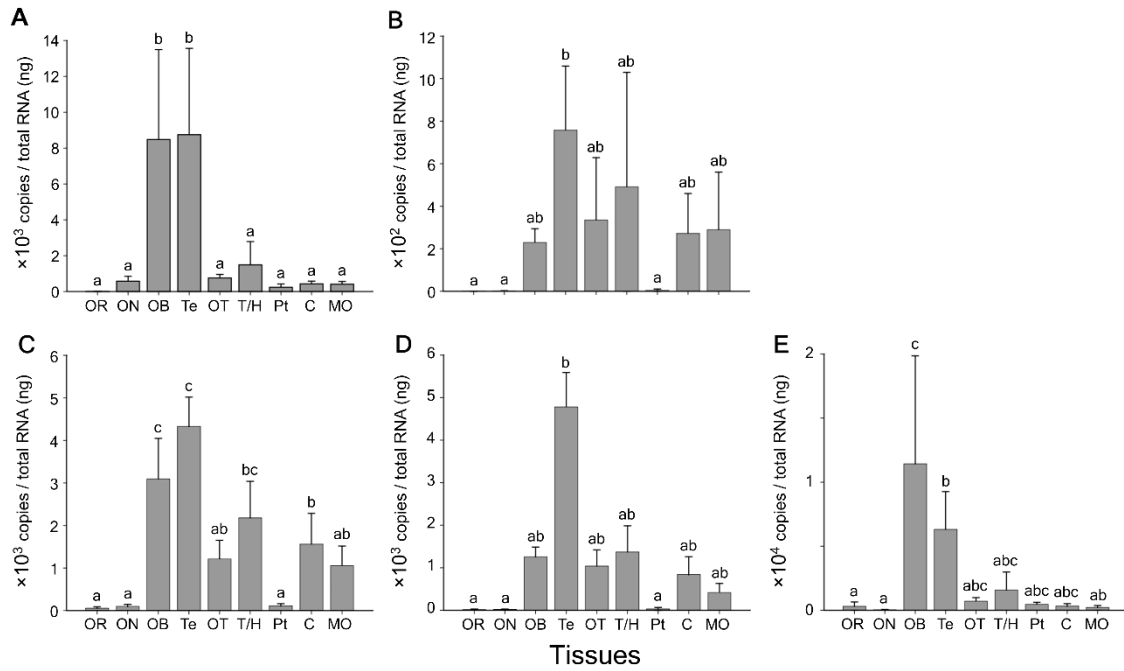


Fig. 13. Expressions analyses of synaptosome-associated protein isoform 25a (*snap25a*: A) and isoform 25b (*snap25b*: B), syntaxin isoform-1a (*stx1a*: C) and isoform-1b (*stx1b*: D), and vesicle-associated membrane protein isoform-2 (*vamp2*: E) in the olfactory organ and brain in the post-upriver male chum salmon using quantitative real-time PCR (qPCR). C: cerebellum, MO: medulla oblongata, OB: olfactory bulb, ON: olfactory nerve, OR: olfactory rosette, OT: optic tectum, Pt: pituitary Te: telencephalon, T/H: thalamus and hypothalamus. Values represent the mean $\pm$ standard error (n=5-7) of copies per sample RNA (ng). Shared letters indicate no significant difference ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test for A, and one-way ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference test for B-E).

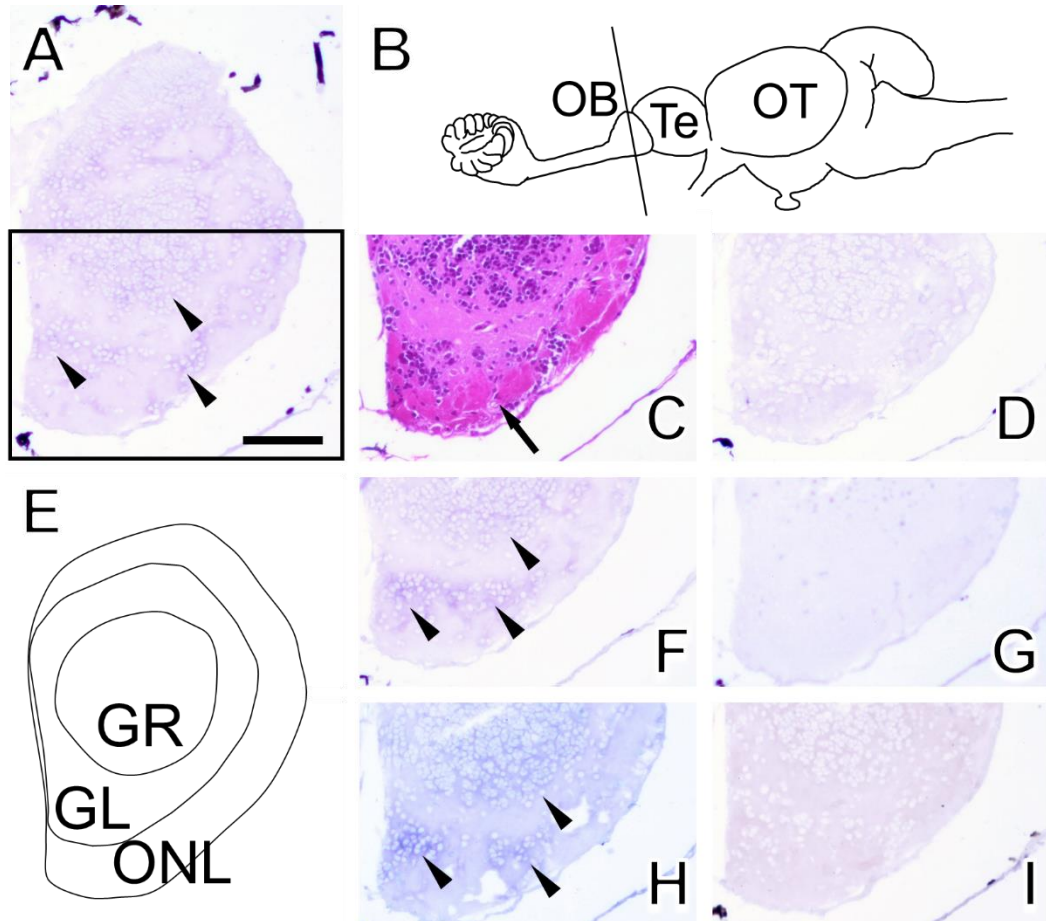


Fig. 14. Expressions of *snap25* (A, D), *stx1* (F, G), and *vamp* (H, I) in the olfactory bulb of juvenile chum salmon. A, F, and H: digoxigenin-labeled *in situ* hybridization using antisense cRNA probe; B: schematic illustration of salmon brain; C: hematoxylin-eosin; D, G, and I: sense cRNA probe, E: schematic diagram of the transverse sections of olfactory bulb, GL (glomerular layer), GR (granule cell layer) and ONL (olfactory nerve layer; arrow). Arrowheads indicate principal signals of *snare* mRNA. Scale bar: 100 μ m.

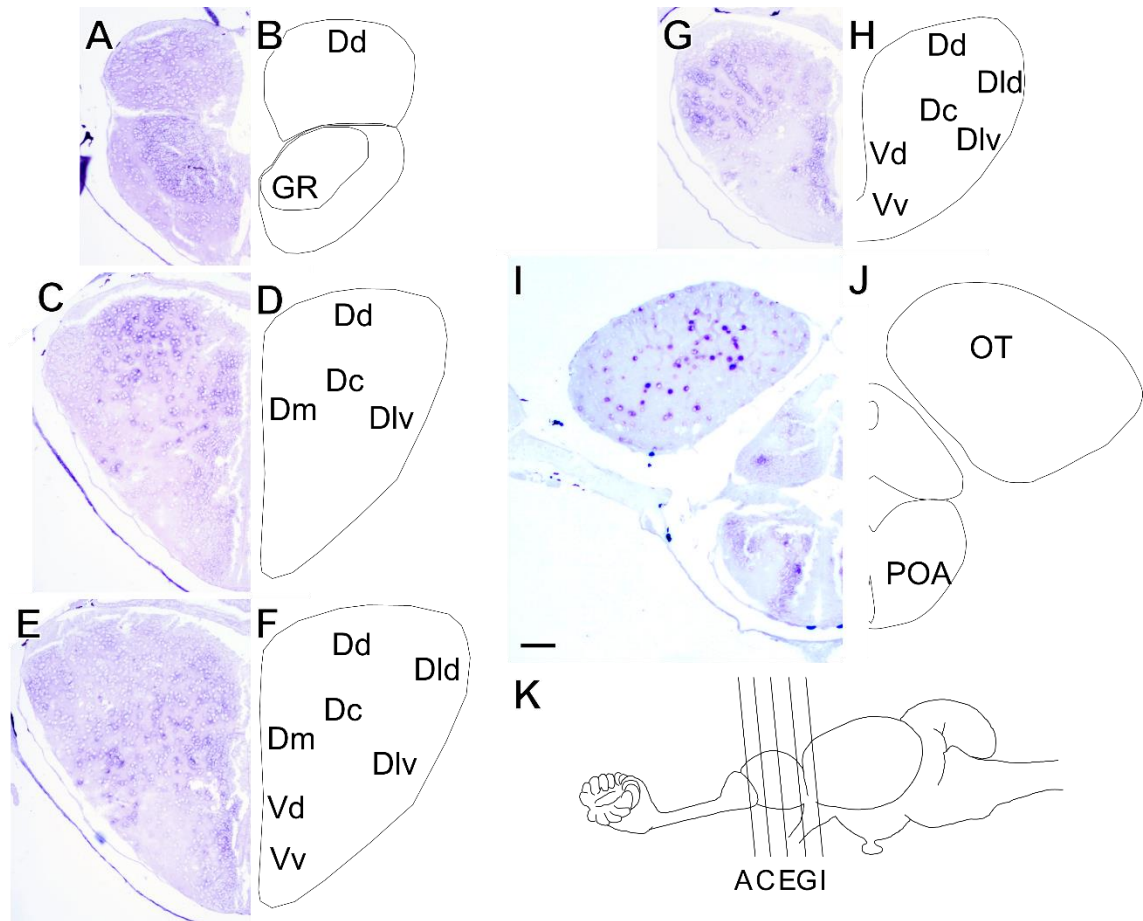


Fig. 15. Expressions of *snap25* in the olfactory bulb and telencephalon of juvenile chum salmon. A, C, E, G, and I: digoxigenin-labeled *in situ* hybridization using antisense cRNA probe; B, D, F, H, and J: schematic diagram of the transverse sections of forebrain, Dc (central area of dorsal telencephalon), Dd (dorsal area of dorsal telencephalon), Dld (dorsal part of lateral area of dorsal telencephalon), Dlv (ventral part of lateral area of dorsal telencephalon), Dm (medial area of dorsal telencephalon), GR (granule cell layer), OT (optic tectum), POA (pre-optic area), Vd (dorsal area of ventral telencephalon), and Vv (ventral area of ventral telencephalon); K: schematic illustration of salmon brain. Scale bar: 100 μ m.

G)。終脳と尾側で接する視索前野 (POA) でもシグナルが検出された (Fig. 15I)。嗅球隣接切片における *stx1* と *vamp* の発現は, *snap25* と同様の局在性を示した (Figs. 14A, F, H)。嗅球から終脳における *stx1* 発現は, 嗅球 GR, 終脳 Dd, Dm, Dld および Dlv, Vd および Vv の各領域で検出された (Figs. 16A, C, E)。また, センス鎖標識プローブを用いた反応では特異的なシグナルは観察されなかった (Fig. 14G)。同 *vamp* 発現も, 嗅球 GR, 終脳 Dd, Dm, Dld および Dlv, Vd および Vv の各領域で検出された (Figs. 17A, C, E)。また, センス鎖標識プローブを用いた反応では特異的なシグナルは認められなかった (Fig. 14I)。3 分子ともに終脳の Dd, Dld および Vv に多数の発現シグナルが強い神経細胞が観察された (Fig. 15-17C, E)。

3-4. 考察

成熟魚の *snap25a* 発現は, げっ歯類の脳吻側 (i.e., 嗅球, 終脳, 視床および視床下部) で *snap25a* 発現が高いという発現分布 (e.g., Boschert et al. 1996, Yamamori et al. 2011) に類似したことから, げっ歯類とサケでは種内での *snap25* アイソフォーム間の機能分化も類似している可能性が考えられた。同 *snap25b* は, 脳全体に発現したが, 脳尾側 (i.e., 小脳および延髄) での発現が高くなかったことから, げっ歯類 *snap25b* 発現分布とは部分的な一致であった。げっ歯類 *snap25s* 発現パターンとの不一致は, 魚類 *snap25s* が分類群に特異的な倍数化により 4 倍体化し, その後の偽遺伝子化を経ていることから (キンギョ; Risinger and Larhammar 1993, ゼブラフィッシュ; Risinger et al. 1998), サケ *snap25s* が独自の分子進化を経て哺乳類とは異なる発現特性を示した可能性がある。本研究で qPCR 解析を行ったサケとカラフトマスでは, 2-3 に示したように, *snap25a* と *snap25b* 共に単一の型のみクローニングされたため, 4 倍体 *snap25s* の発現レベルをタイプごとに解析することはできなかった。

本研究で発現を分析した *snap25a* および *snap25b* の該当するサブタイプの発現は, サケ幼稚魚および成熟魚の嗅房と脳各部位および脳下垂体に発現し, 嗅神経系および嗅覚高次中枢も含む終脳に発現することが確認された。ラット STX1a タンパク発現は嗅球, 終脳, 視床, 延髄および脳下垂体で高く, 嗅球および終脳で

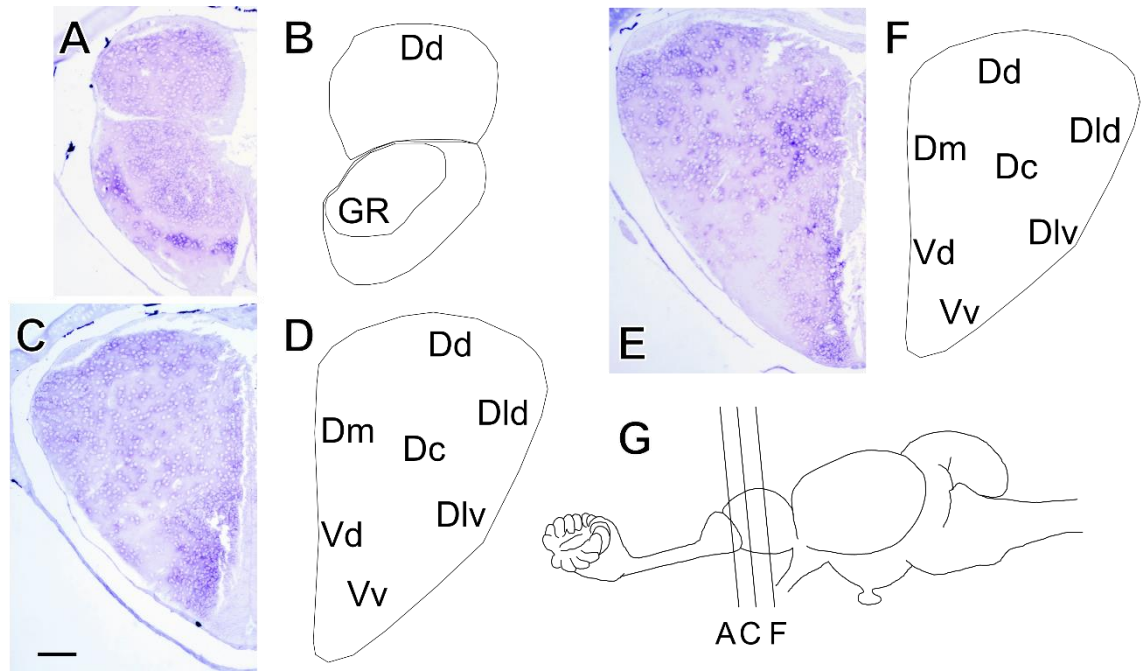


Fig. 16. Expressions of *stx1* in the olfactory bulb and telencephalon of juvenile chum salmon. A, C, and E: digoxigenin-labeled *in situ* hybridization using antisense cRNA probe; B, D, and F: schematic diagram of the transverse sections of forebrain, Dc (central area of dorsal telencephalon), Dd (dorsal area of dorsal telencephalon), Dld (dorsal part of lateral area of dorsal telencephalon), Dlv (ventral part of lateral area of dorsal telencephalon), Dm (medial area of dorsal telencephalon), GR (granule cell layer), OT (optic tectum), Vd (dorsal area of ventral telencephalon), and Vv (ventral area of ventral telencephalon); G: schematic illustration of salmon brain. Scale bar: 100 μ m.

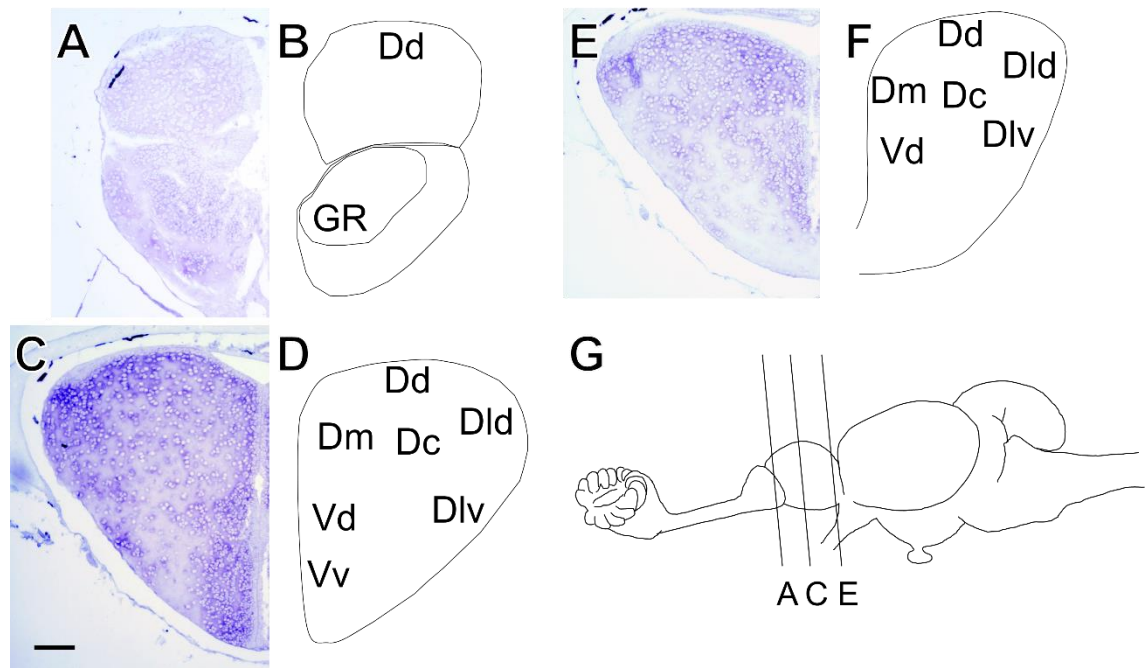


Fig. 17. Expressions of *vamp* in the olfactory bulb and telencephalon of juvenile chum salmon. A, C, and E: digoxigenin-labeled *in situ* hybridization using antisense cRNA probe; B, D, and F: schematic diagram of the transverse sections of olfactory bulb and telencephalon; Dc (central area of dorsal telencephalon), Dd (dorsal area of dorsal telencephalon), Dld (dorsal part of lateral area of dorsal telencephalon), Dlv (ventral part of lateral area of dorsal telencephalon), Dm (medial area of dorsal telencephalon), GR (granule cell layer), OT (optic tectum), Vd (dorsal area of ventral telencephalon), and Vv (ventral area of ventral telencephalon); G: schematic illustration of salmon brain. Scale bar: 100 μ m.

は STX1b 発現も高いことが報告されており (Ruiz-Montasell et al. 1996), 本研究での親魚 *stx1a* および *stx1b* 発現パターンは, これとよく一致した。また, *stx1a* および *stx1b* 発現脳部位は, *snap25s* 発現と類似していた。アフリカツメガエル幼生の主嗅球では, 同一の糸球体における Stx1 と Snap25 のタンパクの共局在が示されていることから (Manzini et al. 2007), サケでも t-SNARE 分子である両分子は, シナプス前膜アクティブゾーンにおいて同所的に発現し, 機能すると考えられた。このような *snare* 遺伝子の同所的な発現は, サケ幼稚魚脳における *in situ* ハイブリダイゼーション解析からも確認できた (Figs. 13A, B, D)。一方, 成熟魚 *vamp2* 発現は, t-Snare 分子とは異なり嗅球での発現が顕著であり, 脳尾側の発現が低い傾向を示したことから, ラット *Vamp2* mRNA および VAMP2 タンパク発現部位と類似していた (Trimble et al. 1990, Raptis et al. 2005)。シナプス前膜に局在する t-Snare 分子とシナプス小胞膜に局在する v-Snare 分子 (Lin and Scheller 2000) では異なる発現パターンを示したものと考えられる。サケ科魚類 *vamp2* は, 2-4 で前述したように分子サイズが 4 アミノ残基異なる 4 型のサブタイプが存在する可能性があるが, 本研究における qPCR 解析では *vamp2* のサブタイプの存在を考慮せずに行った。VAMP2-KO マウスでは, 海馬ニューロン初代培養細胞のシナプス前膜において開口放出可能プールへのシナプス小胞の補充が阻害されることから (Deák et al. 2004), *vamp2* 発現は開口放出可能なシナプス小胞の存在を強く反映すると考えられる。そのため, サケ *vamp2* 発現が嗅球と終脳で顕著であったことは, 遡上後個体の嗅神経系における活発なシナプス伝達を示すものと考えられる。脳下垂体についての *snare* 発現は, t-Snare 分子が終脳または脳各部位に比べ有意に低い発現であったのに対し, 脳下垂体 *vamp2* 発現は他の脳部位 (i.e., 視蓋, 小脳および延髄) と同程度の発現レベルを示した。アフリカツメガエル下垂体では, Snap25a および Snap25b タンパク発現が報告されている (Kolk et al. 2001, 2004)。げっ歯類の下垂体では, Snap25a, Stx1a 発現および強い Vamp2 発現に加え (マウス: Oyler et al. 1991, ラット: Jacobsson and Meister 1996), ラット腺性下垂体の分泌顆粒画分に VAMP2 が多いことが示されている (Majó et al. 1998)。このことから, サケ脳下垂体でも Vamp2 を含む Snare タンパクは, タンパク/ペプチドホルモンの開口放出による血中への内分泌にも機能すると考えられた。脳下垂体における *snap25s* および *stx1s*

の t-Snare 分子の低い発現レベルは、産卵場所まで到達していた親魚の脳下垂体では内分泌系の機能が低下していた可能性がある。他方、サケの内分泌系には、本研究で塩基配列が明らかになっていない別の *snap25* および *stx1* サブタイプが発現し機能している可能性も考えられた。遡上後の成熟魚の脳各部位における各 *snare* 遺伝子の発現は、*snap25b* と *stx1b* は終脳で、*snap25a*, *stx1a* および *vamp2* は嗅球と終脳で高かった。また、*stx1a* は視床と視床下部を合わせた部位でも高いことから発現脳部位は分子間で異なったが、脳吻側での発現が高い傾向は共通していた。終脳における *snare* 発現は、遡上時の母川記憶の想起のみならず、産卵に関連した性成熟やフェロモン受容を含む個体間相互作用に関わる神経活動も反映したと考えられる。

in situ ハイブリダイゼーション解析では、プローブに相当する領域の *snap25a* および *snap25b* のアイソフォーム間の塩基配列相同性が 92.6%であり、cRNA プローブへの DIG 標識はランダムであること、プローブは断片化されてハイブリダイズすることからも、2 種類のアイソフォームを区別できないと考えられた。*stx1a* および *stx1b* は、プローブに相当する領域は 67%相同であり、サケ幼稚魚での qPCR 解析では両アイソフォームの発現量は同程度であったことから、*stx1b* が主体ではあるが *stx1a* の発現も検出していると考えられた。本研究では塩基配列を得られていないが、サケ類でも *vamp1* アイソフォームの存在がゲノム情報より推定されている。両 *vamp* アイソフォームの本プローブに相当する領域の塩基配列相同性は、サケでは不明であるが、ニジマスでは約 70%であることから (*vamp1*: XM021590660.2, *vamp2*: XM021618535.2), 両アイソフォームを検出すると考えられた。そのため、本研究の *in situ* ハイブリダイゼーション解析では、各分子のアイソフォームを区別していないと判断して *snap25*, *stx1*, *vamp* として扱った。サケ嗅球における *snap25*, *stx1* および *vamp* 発現は、僧帽細胞および顆粒細胞で検出された。僧帽細胞は、樹状突起で嗅細胞軸索とシナプス結合しているが、神経終末はより高次のニューロンとシナプス結合することから、嗅覚情報の二次以上の高次への投射に機能する Snare タンパクとなる遺伝子発現を検出したと考えられた。アフリカツメガエルでは、嗅球僧帽細胞および顆粒細胞における *snap25a* および *snap25b* 発現が報告されており (Kolk et al. 2004), 本結果を支持している。ま

た、顆粒細胞層のニューロンは、細胞体が小さい細胞が密集し、細胞質の領域も狭いことからシグナルが顕著に観察されたと考えられた。

終脳における *snare* mRNA 発現領域を、ニジマス前脳の蛍光トレーサー (1,1'-ジオクタデシル-3,3,3',3'-テトラメチルインドカルボシアニン過塩素酸; DiI) を用いたコネクトーム解析で示されている領域区分 (Folgueira et al. 2004a, 2004b) および真骨魚類における高等脊椎動物との機能的相同領域 (Yamamoto et al. 2007, Yamamoto 2009) と比較する。サケ幼稚魚終脳の *snare* 発現は、サケ類において嗅神経軸索が直接投射する終脳腹側 (Vd+Vv; Riddle and Oakley 1992, Becerra et al. 1994, Folgueira et al. 2004a, 2004b) でも検出されたことから、嗅球 GL と同様に嗅覚情報を受容するニューロンでの *snare* 遺伝子の発現が示唆された。嗅球を介した二次~高次の嗅覚ニューロン投射領域である終脳 Dp, Vv, Dlv および Dc および間脳 POA (Folgueira et al. 2004a, Yamamoto et al. 2007) でも *snare* 発現が検出されたことから、本研究で検出したサケ *snare* 遺伝子は、嗅覚情報のより高次中枢での情報処理に関与していると考えられた。ヒメマスでは、海馬の機能的相同領域と考えられる終脳 D1 領域 (Nikonov et al. 2005) において母川水刺激により神経活動が活発になることが機能的核磁気共鳴画像法により示されている (Bandoh et al. 2011)。このことから、終脳 D1 領域における顕著な *snare* 遺伝子の発現は、嗅覚を含む母川記憶の形成に強く関連していると考えられる。また、*snare* 遺伝子のシグナルが顕著であった終脳 Vv 領域は、嗅球と吻側で接し、嗅覚の二次投射を受ける領域であることから (Folgueira et al. 2004a), 嗅覚情報の処理に関わる嗅覚高次中枢を構成する領域であると考えられる。以上のことから、サケ幼稚魚において各 *Snare* 分子は、嗅覚情報の高次中枢への伝達と記憶形成に機能すると考えられた。

第4章 嗅神経系における *snare* 遺伝子の回遊に伴う発現変化

4-1. 背景と目的

第2章および第3章でサケ類嗅覚中枢における *snare* 遺伝子の発現を検出したが、嗅覚刷込およびその記憶を想起する回遊時期での発現動態は不明である。サケ類の母川のニオイ情報の嗅覚刷込に強く関わる降海期には、タイセイヨウサケ幼魚の銀化変態 (PST) 期に脳全体の神経伝達物質濃度が一時的に上昇すること (Ebbesson et al. 1992, 1996), サケ幼稚魚の降河時に NMDA 型グルタミン酸受容体 NR1 サブユニット遺伝子発現が上昇することから (Ueda et al. 2016), 神経可塑性が高まっていると考えられる。サケ科魚類 (Salmonidae) の母川回帰には、母川のニオイを憶える嗅覚刷込仮説 (Wisby and Hasler 1954) と1年間を通じて河川に幼稚魚が生息する種での同種幼魚のニオイを手掛かりにしているフェロモン説 (e.g., Nordeng 1971) が対立する仮説とされてきた。フェロモン説単独では、親魚が回帰・遡上する秋季には、河川に同種の幼魚が存在しないサケとカラフトマス
の母川回帰を説明できない。近年では、産卵場からの距離に応じて地磁気や海流
< 同種他個体のニオイ < 母川のニオイの順で、手掛かりに階層性が存在するという仮説が提唱されている (階層的航法仮説; Bett and Hinch 2016)。このことから、母川回帰では、外洋域から沿岸域までの海洋フェーズと沿岸域から河川上流域までの河川フェーズのそれぞれに異なる外部刺激に対して鋭敏になる必要があるが、その神経活動に関わる感覚器官と脳領域は複雑な神経回路を形成していると考えられる。刷込・想起の両時期と時空間的に離れた外洋での索餌回遊期は、成長期でもあるため神経可塑性は高いことが予想されるが、母川由来の刺激と完全に隔たっていることから母川刷込と想起に関係が低い時期の比較対象として分析する価値が高く、本学部では練習船での実習航海を利用して、その時期の標本が活魚で採集できる。一方、近年、タイセイヨウサケ幼稚魚の野生魚とふ化場魚の異なる生育環境が中枢神経系の発達に与える影響が示唆されている (Mes et al. 2018)。また、生態学的観点からは、サケ類のふ化場魚が野生魚に比べて適応度が低く、個体間相互作用においても負の影響があるといった議論がなされている (Morita et al. 2006, Hasegawa et al. 2014)。本章では、サケ類の嗅覚刷込および記憶想起に関

わると考えられる回遊時期における *snare* 遺伝子の発現動態を明らかにすることを目的として、サケおよびカラフトマスの嗅神経系における *snare* 3 分子の mRNA 発現量の回遊に伴う変化を定量解析した。併せて、嗅神経系における *snare* 遺伝子の発現量からサケ稚魚における野生魚とふ化場魚の神経系発達およびシナプス可塑性の差があるかについて検証した。

4-2. 材料と方法

4-2-1. 供試魚

サケ (シロザケ) の解析には、1) 降海前、2) 降海中、3) 降海後幼稚魚、4) 索餌回遊期末成熟魚、5) 沿岸成熟途上魚、6) 遡上初期成熟魚、7) 遡上中盤成熟魚および 8) 産卵場に到達した遡上後成熟魚の各生活期のサケ雄を用いた。採集した個体は、炭酸ガス水により不動化・魚体測定した後、嗅覚器官 (嗅房)、嗅球および終脳を剖出し、得られた組織を RNA 保護保存液に 4 °C で一晩浸漬し、-30 °C で冷凍保存した。供試魚の尾叉長 (mm)、体重 (g)、採集日、採集方法の情報は Table 3 に、外部形態は Fig. 18 に、採集点は Fig. 19 に示した。降海前 (含む降海初期個体) の稚魚は、2017 年 3 月 22 日に北海道南西部八雲町の遊楽部川上流域 (42°17'29"N, 140°07'43"E)、降海中の幼稚魚は、同年 4 月 20 日に同河川の中・下流域 (42°15'31"N, 140°15'16"E) で電撃漁具を用いて採集した。降海中個体の一部は、本学部先端環境制御実験棟恒温飼育室にて、水温 10°C の人工海水により 2 週間育成した後、同年 5 月 5 日に組織を剖出し、降海後相当の前期幼魚とした。外洋索餌回遊中個体は、2017 年 5 月 15~18 日に北太平洋西部海域 (43°01'N, 155°00'E) で、本学部附属練習船おしよろ丸 V 世の実習航海において手釣りおよび延縄により雄 6 個体を採集した。母川遡上前の成熟途上個体は、2016 年 10 月 23 日に遊楽部川河口に近い八雲町沖 (42°15'33"N, 140°17'17"E) の定置網で漁獲された雄 5 個体を用いた。遡上初期個体は同年 11 月 10 日に遊楽部川の中・下流域で雄 5 個体を電撃漁具により採集し、遡上中盤個体は 2019 年 11 月に同中流域のサケ捕獲施設 (ウライ; 河口より約 6.7 km 上流, 42°16'00"N, 140°12'34"E) で雄 6 個体の供与を受け、遡上後個体は、同年 11 月 24 日に同上流域の支流セイヨウベツ川の産卵場付近で雄 5 個体を電撃漁具で採集した。

Table 3. Data sets of the seaward, feeding and homeward migrating chum salmon, *Oncorhynchus keta*, in this study, respectively. Values of fork length (distance from the tip of the snout to the center of the fork in the caudal fin, mm) and body weight (g) are expressed as mean $\pm$ standard error. Date and location of capture, sampling gear and sample size (individuals) are also shown.

Stage	Fork length (mm)	Body mass (g)	Number of samples	Date	Gear	Location or source
Pre-seaward fry	39.3 $\pm$ 0.80	0.42 $\pm$ 0.03	5	22-March-2017	Electric shocker	Upper reaches of Yurappu River
Seaward juvenile	52.7 $\pm$ 2.17	1.07 $\pm$ 0.12	5	20-April-2017	Electric shocker	Lower reaches of Yurappu River
Post-seaward juvenile	51.9 $\pm$ 1.94	0.97 $\pm$ 0.13	12	11-May-2016, 5-May-2017	—	Seawater rearing in laboratory
Feeding immature	541 $\pm$ 20.5	1751 $\pm$ 263.8	6	15 to 18-May-2017	Angling	Northwest Pacific Ocean (43°N, 155°E)
Pre-upriver maturing	763 $\pm$ 22.1	4432 $\pm$ 452.7	5	23-October-2016	Set net	Coastal waters off Yakumo Town
Early-upriver maturing	764 $\pm$ 13.3	4793 $\pm$ 283.8	5	10-November-2016	Electric shocker	Lower reaches of Yurappu River
Mid-upriver maturing/mature	730 $\pm$ 13.1	4425 $\pm$ 341.3	5	12-November-2019	Weir	Middle reaches of Yurappu River
Post-upriver mature	704 $\pm$ 17.6	3332 $\pm$ 389.3	8	24-November-2016	Electric shocker	Upper reaches of Yurappu River

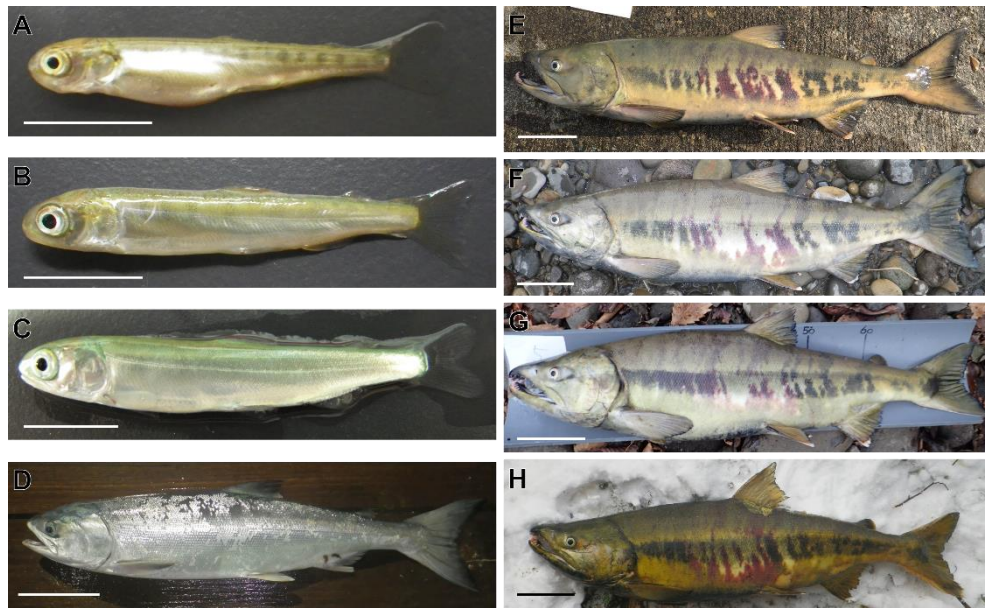


Fig. 18. External morphologies of chum salmon at different stages during seaward, feeding, and homeward migrations. A: Pre-seaward fry, B: Seaward juvenile, C: Post-seaward juvenile, D: Feeding immature, E: Pre-upriver maturing, F: Early-upriver maturing, G: Mid-upriver maturing/mature, and H: Post-upriver mature. Scale bars: 10 mm for A-C, 100 mm for D-H.

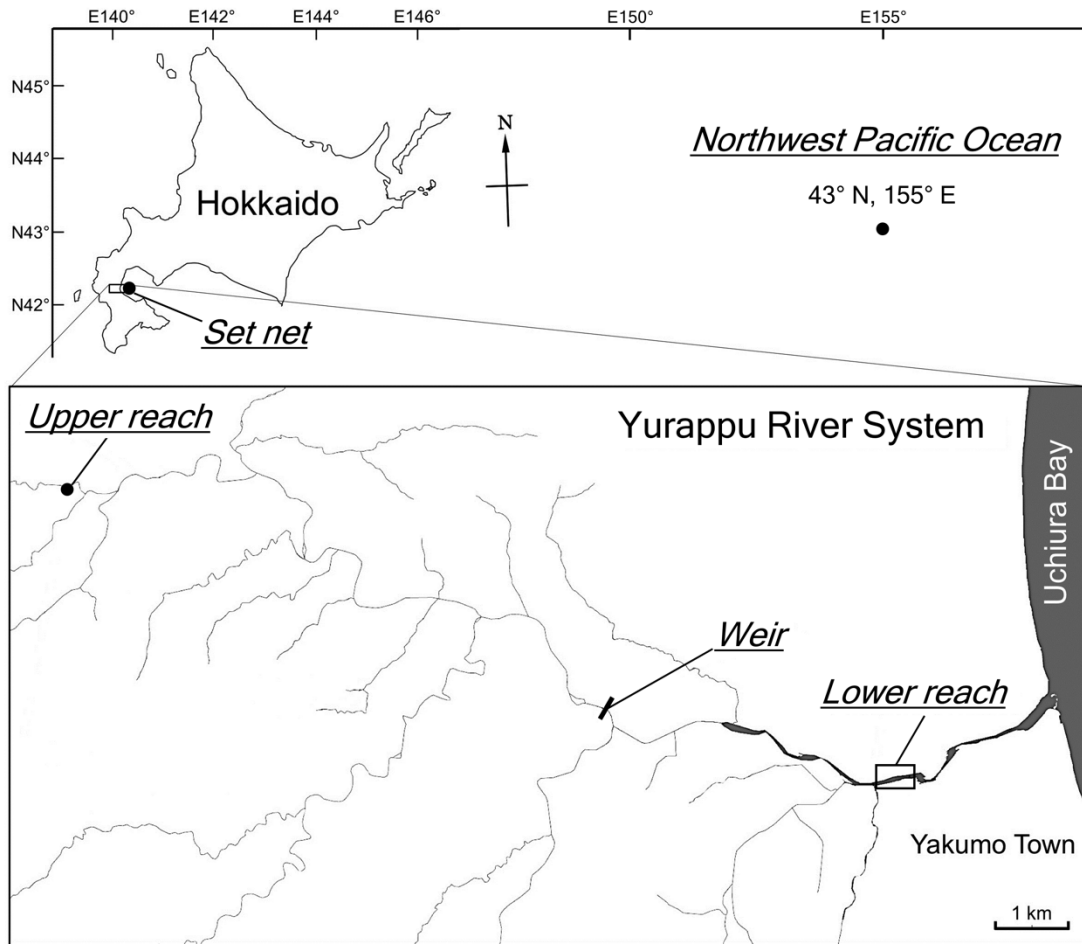


Fig. 19. Fish collection sites. Upper: Dots indicate the area of collection of immature chum salmon in the Northwest Pacific Ocean (43°00'N, 155°00'E) and set net (collection of maturing male). Lower: Enlarged view of Yurappu River system in Southern Hokkaido, Japan. Upper reaches of Yurappu River (collection of pre-seaward juvenile and post-upriver adult male), Lower reaches of Yurappu River (collection of seaward juvenile and adult beginning upriver migration), and Weir in the middle reaches (collection of adults in the middle of upriver migration). Post-seaward juveniles were collected at the lower reaches and maintained in artificial seawater.

上流域にあるふ化場から放流され海までの河川移動距離が比較的長い (約 17 km) 遊楽部川において、嗅覚刷込時期と考えられる降海期を降河行動期間としてより細分化し、サケ幼稚魚における *snare* 遺伝子の発現変動を解析するため、2017、2018 および 2019 年春季に同川および上流域の支流セイヨウベツ川で採集したサケ幼稚魚を放流魚の耳石温度標識の確認により放流後の日数で区分して発現解析を行った (Table 4)。供試魚には、1) 降河前ステージ: 2017~2019 年の各年 3 月に遊楽部川上流域の支流セイヨウベツ川で採集した卵黄嚢が一部残る混合栄養期個体を含む早期稚魚 (FL < 40 mm, n = 9) および降河前稚魚 (FL > 40 mm, n = 7)。2) 降河中ステージ: 遊楽部川中・下流域で電撃漁具により採集した降河中の国立研究開発法人水産研究・教育機構 (現) 水産資源研究所さけます部門八雲事業所より放流されたサケ幼稚魚。各個体の扁平石の研磨標本から耳石温度標識 (例として Fig. 20) を確認し、採集日と北太平洋溯河性魚類委員会 (NPAFC) が公開 (<http://wgosm.npafc.org/>) している放流日から特定した放流後日数の近いグループに区分し、降河中幼稚魚を放流後 2-3 日 (n=6), 9-10 日 (n=15), 12-15 日 (n=6) および 24-27 日 (n=6) の 4 区分に細分化した。3) 降河後ステージ: 降河中個体の一部を人工海水で 2 または 4 週間育成した降河後相当幼魚 (小型: FL < 60 mm, n = 8 および大型: FL > 60 mm, n = 6)。以上の 3 ステージ 8 区分の降河期サケ幼稚魚を用いた。供試魚の外部形態は、Fig. 21 に示した。供試魚の尾叉長は、比較した各ステージ間で、降河前早期稚魚および降河前稚魚に比べて、放流 2-3 日後 ≤ 同 9-10 日後 = 同 12-15 日後 ≤ 同 24-27 日後 = 降河後小型稚魚 < 降河後大型稚魚の順に大型であった (Fig. 22)。同じく体重は、降河前早期稚魚 ≡ 降河前稚魚 ≤ 放流 2-3 日後 ≤ 同 9-10 日後 ≡ 同 12-15 日後 ≤ 同 24-27 日後 ≤ 降河後小型稚魚 < 降河後大型稚魚の順に大型であった (Figs. 22A, B)。一方、供試魚の肥満度は、比較したステージ間で違いは無かった (Fig. 22C)。

サケ稚魚の嗅神経系発達における野生魚とふ化場魚の違いを検証するため、同じく遊楽部川上流域の支流セイヨウベツ川で採集したサケふ化場魚および自然産卵由来個体 (以下、野生魚) において *snare* 3 分子の発現解析を行った。本項での野生魚は、過去の報告における定義に従い、親の由来は問わず自然産卵由来の個体とした (森田・大熊 2015)。供試魚の採集地点および周辺の支流に関する情報を

Table 4. Data sets of the downstream migrating juvenile chum salmon, *Oncorhynchus keta*, in this study, respectively. Values of fork length (distance from the tip of the snout to the center of the fork in the caudal fin, mm) and body weight (g) are expressed as mean $\pm$ standard error. Collection date and individual numbers were represented for each otolith code collected from sample fish, release date, and days post release in river or description about the treatment of sample fish. Date and location of capture, sampling gear and sample size (individuals) are also shown.

Stages	Collection date	Individual numbers	Fork length (mm)	Body weight (g)	Otolith code	Release date	Days in river / Descriptions
Pre-downstream	22 March 2017	5	39.3 $\pm$ 0.80	0.42 $\pm$ 0.03	-	-	Alevin~Juvenile
	14 March 2018	6	39.3 $\pm$ 1.08	0.37 $\pm$ 0.03	-	-	Alevin
	19 March 2019	5	37.1 $\pm$ 0.68	0.38 $\pm$ 0.02	-	-	Alevin
Downstream	20 April 2017	1	47.95	0.797	2,3n-4nH	17 April 2017	3
		7	53.3 $\pm$ 1.14	1.12 $\pm$ 0.06	2,3n-3nH	10 April 2017	10
		2	49.4 $\pm$ 3.23	0.93 $\pm$ 0.18	2,3n-2nH	05 April 2017	15
		1	57.73	1.342	2,2n-4nH	24 March 2017	27
	25 April 2018	5	49.6 $\pm$ 0.85	0.82 $\pm$ 0.05	2,2n,3nH	23 April 2018	2
		3	54.4 $\pm$ 2.15	1.14 $\pm$ 0.13	2,3n-4nH	03 April 2018	22
	21 April 2019	5	47.7 $\pm$ 1.10	0.75 $\pm$ 0.06	2,3n-4nH	12 April 2019	9
		4	49.7 $\pm$ 0.74	0.88 $\pm$ 0.04	2,3n-3nH	09 April 2019	12
		3	54.6 $\pm$ 1.30	1.19 $\pm$ 0.07	2,3n-2nH	28 March 2019	24
		2	54.8 $\pm$ 0.70	1.22 $\pm$ 0.05	2,2n-4nH	25 March 2019	27
Post-downstream	05 May 2017	5	55.9 $\pm$ 1.92	1.17 $\pm$ 0.17	-	-	Reared in sea water for 2 weeks
	23 May 2018	4	57.5 $\pm$ 1.44	1.43 $\pm$ 0.15	-	-	Reared in sea water for 4 weeks
	24 May 2019	5	61.4 $\pm$ 1.40	1.61 $\pm$ 0.15	-	-	Reared in sea water for 4 weeks

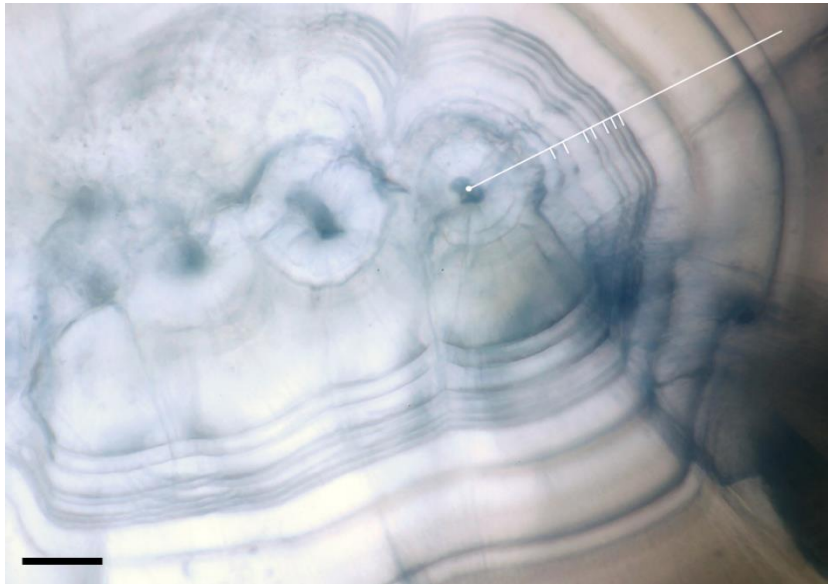


Fig. 20. Microscopy image of otolith marking from juvenile chum salmon collected at the lower reaches of Yurappu River on 25 April 2018, Hokkaido, Japan. Bar code: 2,2n,3nH, released from Yakumo Hatchery, Fisheries Research Agency on 23 April 2018. Scale bar: 100 μm .

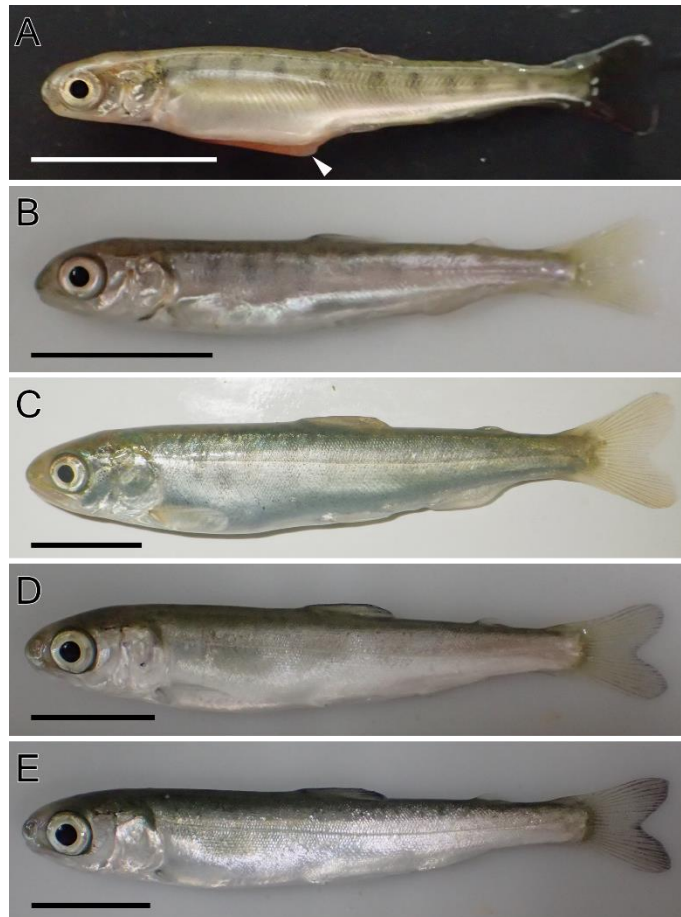


Fig. 21. External morphologies of chum salmon at different stages during downstream migration. A: Pre-downstream (Fork length [FL] < 40 mm), B: Pre-downstream (FL > 40 mm), C: Downstream, D: Post-downstream (FL < 60 mm), E: Post-downstream (FL > 60 mm). Arrowhead: Yolk sac. Scale bars: 10 mm.

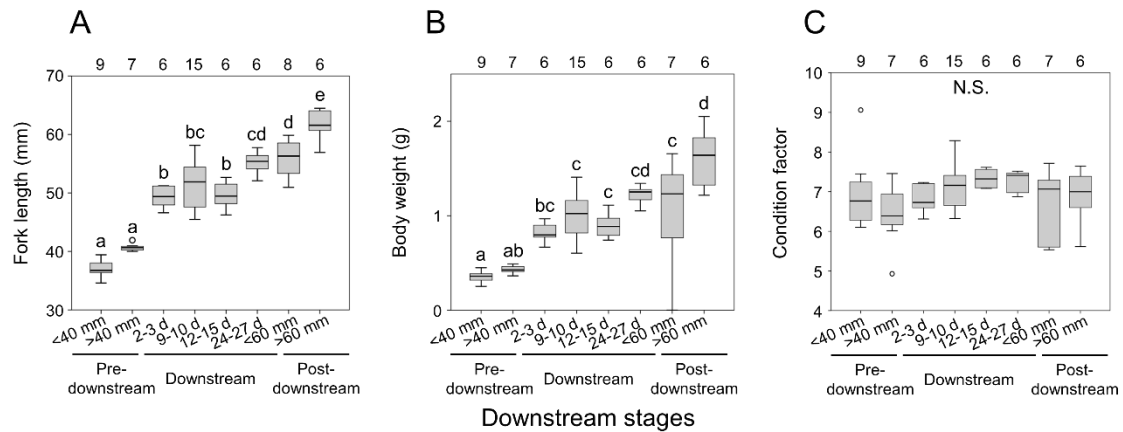


Fig. 22. The information of sampled chum salmon, A: Fork length (mm), B: body weight (g) and C: condition factor of chum salmon during downstream migration. Numbers on the top of graphs indicate individual numbers of each column. Boxes: 25-75 percentile range, bold lines: median, whiskers: minimum and maximum values exclude outliers (open circles: $< \times 1.5$ interquartile range). Pre-downstream stage was divided to two substages based on FL, < 40 mm and > 40 mm. Downstream stage was divided to four substages based on days after released from hatchery, 2-3 d, 9-10 d, 12-15 d, and 24-27 d. Post-downstream stage was divided to two substages based on FL, < 60 mm and > 60 mm. Shared letters indicate no significant difference ($p < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference test). N.S. (no significance): showed no significant differences between stages ($p > 0.05$).

Fig. 23 に示す。採集点は、放流するサケ幼稚魚の全個体に耳石温度標識を施している水産研究・教育機構八雲さけます事業所の約 290 m 下流に位置し (42°17'28.0"N 140°07'42.0"E), 毎年秋~冬季にはサケの自然産卵が行われている (Fig. 24)。遊楽部川本流の上流には耳石に標識を施さずに放流を行う渡島管内さけ・ます増殖事業協会遊楽部ふ化場が存在する。しかしながら, Fig. 22 に示すように, 採集地点は本流との合流点 (42°17'29.5"N 140°07'59.2"E) より約 790 m 上流のため無標識放流個体の混入は考え難いことから, 採集点で耳石温度標識が無い個体を野生魚とした。解析に用いた供試魚は, ふ化場魚と野生魚の尾叉長 (ふ化場魚: 41.34 mm, 野生魚: 40.98 mm, $p = 0.613$; t -検定) および体重 (ふ化場魚: 0.469 g, 野生魚: 0.421 g, $p = 0.277$; t -検定) に差が無いことを確認した (Figs. 25A, B)。供試魚は, 炭酸ガス水で不動化後, 嗅房, 嗅球および終脳を剖出し, RNA 保護保存液中で凍結保存した。

カラフトマスの解析には, 1) 稚魚, 2) 索餌回遊中の外洋未成熟魚, 3) 沿岸成熟途上魚および 4) 河川遡上中の成熟魚を用いた。稚魚は, 2019 年 4 月に北海道東部網走市の北見管内さけ・ます増殖事業協会網走ふ化場 (43°59'N, 144°13'E) で育成されていた 3 個体分をプールして 1 標本として用いた。外洋未成熟魚は, 2018 年 5 月に北太平洋西部海域 (43°00'N, 155°00'E) で, 練習船おしよろ丸実習航海にて手釣りにより採集した。沿岸の成熟途上魚は, 2018 年 8 月に網走市沖の沿岸定置網 (44°02'N, 144°15'E) にて漁獲された雄を, 河川遡上中の成熟魚は, 同年 9 月に網走川下流のウライ (44°01'N, 144°14'E) で捕獲された雄をそれぞれ用いた。供試魚の外部形態は Fig. 26 に, 尾叉長 (mm), 体重 (g), 生殖腺重量 (g), 生殖腺体指数 (GSI), 採集日, 採集方法および採集地点の情報は Table 5 に, 採集地点は Fig. 27 に示した。回帰親魚の成熟度は, 外部形態および GSI (Table 5) をもとに区分した。

4-2-2. 定量的発現解析

プールしたサケ幼稚魚の嗅覚中枢組織からディスポーザブルマイクロチューブタイプホモジナイザー (TaKaRa BioMasher Standard; タカラバイオ社) と ISOGEN (ニッポンジーン社) を用いて全 RNA を抽出し, さらに RNA Clean-up Kit で高度

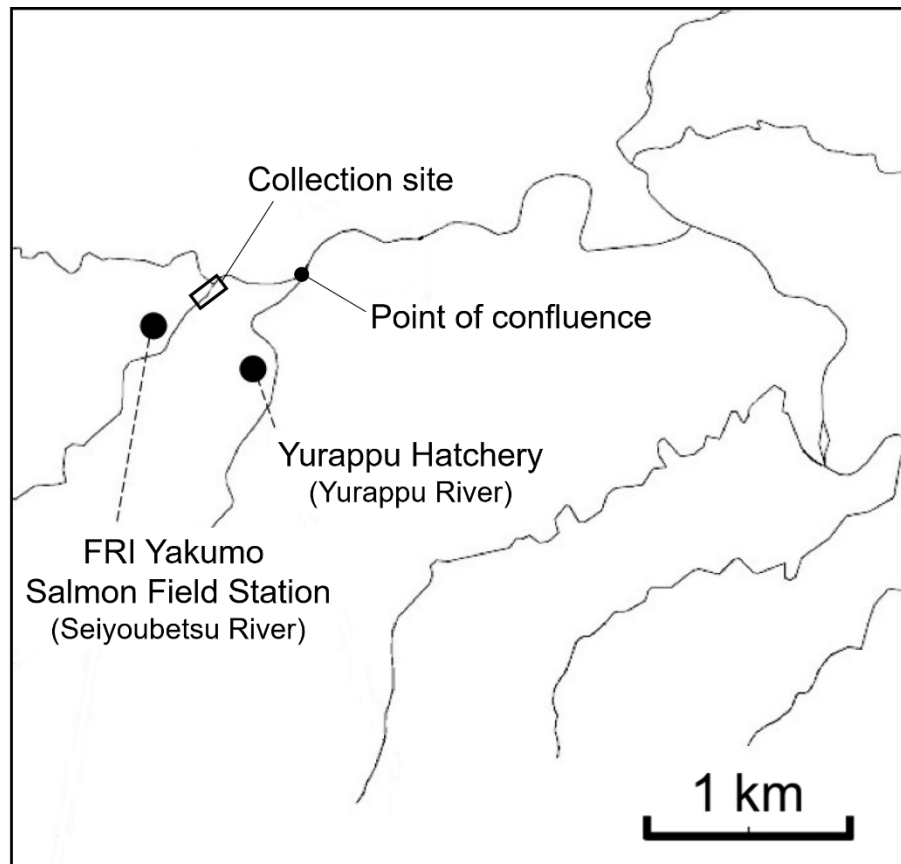


Fig. 23. Fish collection site in the Seiyoubetsu River, a branch in the upper reaches of Yurappu River system. Collection site was 290 m downstream from the release site (Fisheries Resources Institute [FRI] Yakumo Salmon Field Station).



Fig. 24. Mating behavior of adult chum salmon (*Oncorhynchus keta*) before spawning in the Seiyoubetsu River, a branch from upper reaches of Yurappu River, Yakumo, Hokkaido. Arrows indicate mating individuals.

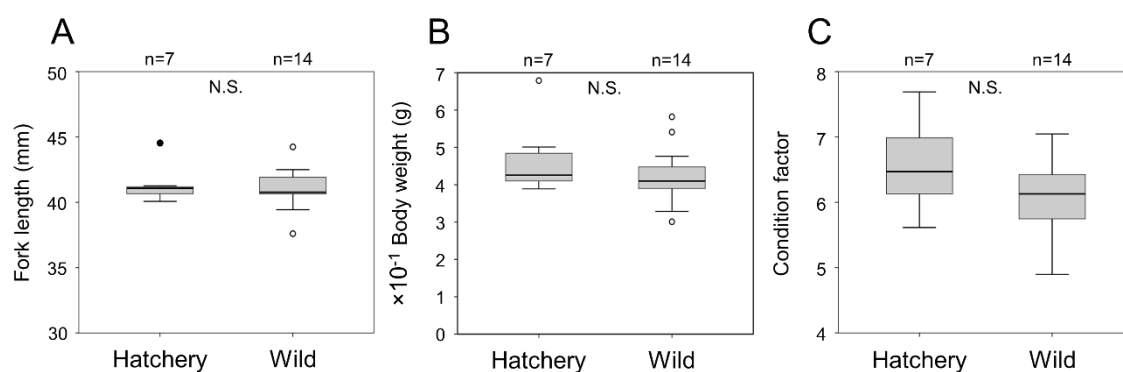


Fig. 25. The information of sampled chum salmon, **A**: Fork length (mm), **B**: body weight (g) and **C**: condition factor of hatchery-reared and wild juvenile chum salmon. $n=7$ and $n=14$; sample numbers of each column. Boxes: 25-75 percentile range, bold lines: median, whiskers: minimum and maximum values exclude outliers (open circles: $< \times 1.5$ interquartile range [IQR], solid circles: $> \times 1.5$ IQR). N.S. (no significance): showed no significant differences between two groups ($p > 0.05$, t -test).

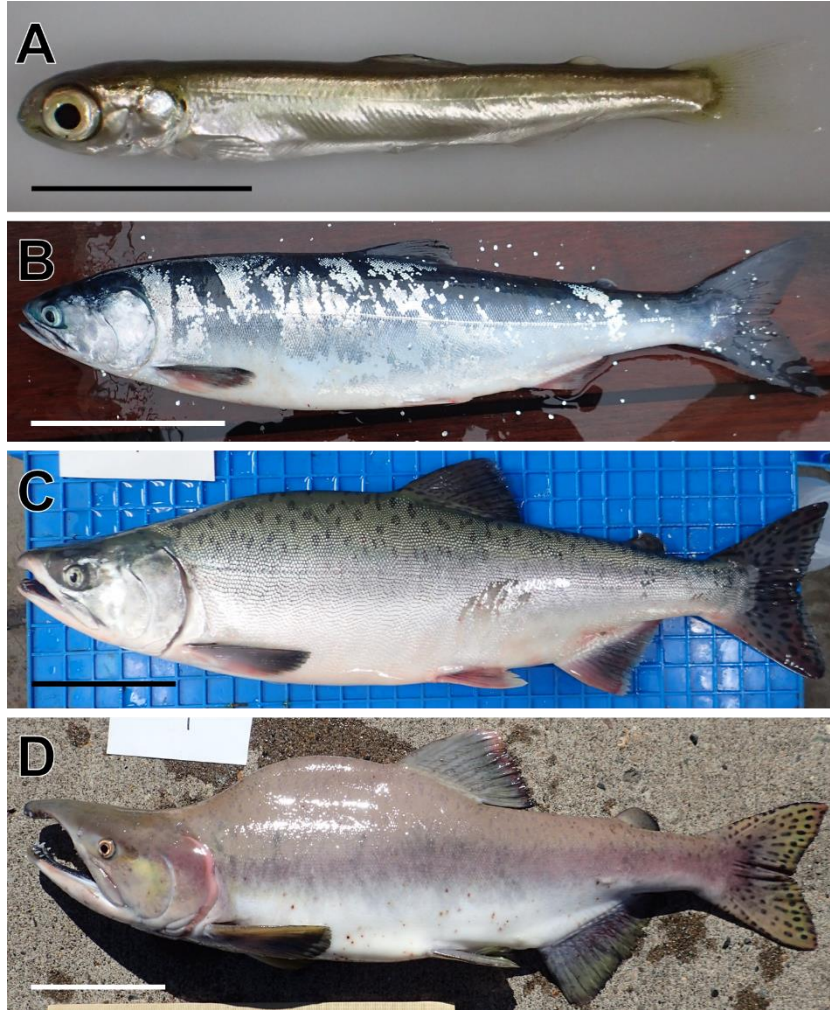


Fig. 26. External morphologies of pink salmon at different stages during seaward, feeding, and homeward migration. A: Seaward fry, B: Feeding immature male, C: Pre-upriver maturing male, D: Upriver mature male. Scale bars: 10 mm for A, 100 mm for B-D.

Table 5. Data sets of seaward, feeding, and homeward migrating pink salmon, *Oncorhynchus gorbuscha*. Values of fork length (mm), body weight (g), gonad weight (g) and gonad-somatic index (GSI) are expressed as the mean $\pm$ standard error. The date and location of capture, sampling gear, and number of individuals are also shown. Gonad weight of mature males were not available because of spermiation.

Stage	Fork length (mm)	Body mass (g)	Number of individuals	Gonad weight (g)	GSI	Date	Gear	Location or source
Seaward fry	36.4 $\pm$ 0.62	0.23 $\pm$ 0.02	21	—		28-April-2019	—	Abashiri Yobito Hatchery
Feeding immature	377 $\pm$ 7.74	508 $\pm$ 24.5	5	3.2 $\pm$ 1.0	0.62 $\pm$ 0.18	14 to 15-May-2018	Angling	Northwest Pacific Ocean (43°00'N, 155°00'E)
Pre-upriver maturing	503 $\pm$ 13.3	1442 $\pm$ 149.0	7	96.0 $\pm$ 18.6	9.51 $\pm$ 0.79	30-August-2018	Set net	Coastal waters off City of Abashiri (44°03'N, 144°26'E)
Upriver mature	564 $\pm$ 2.54	1718 $\pm$ 93.19	7	—	—	18-September-2018	Weir	Lower reaches of Abashiri River

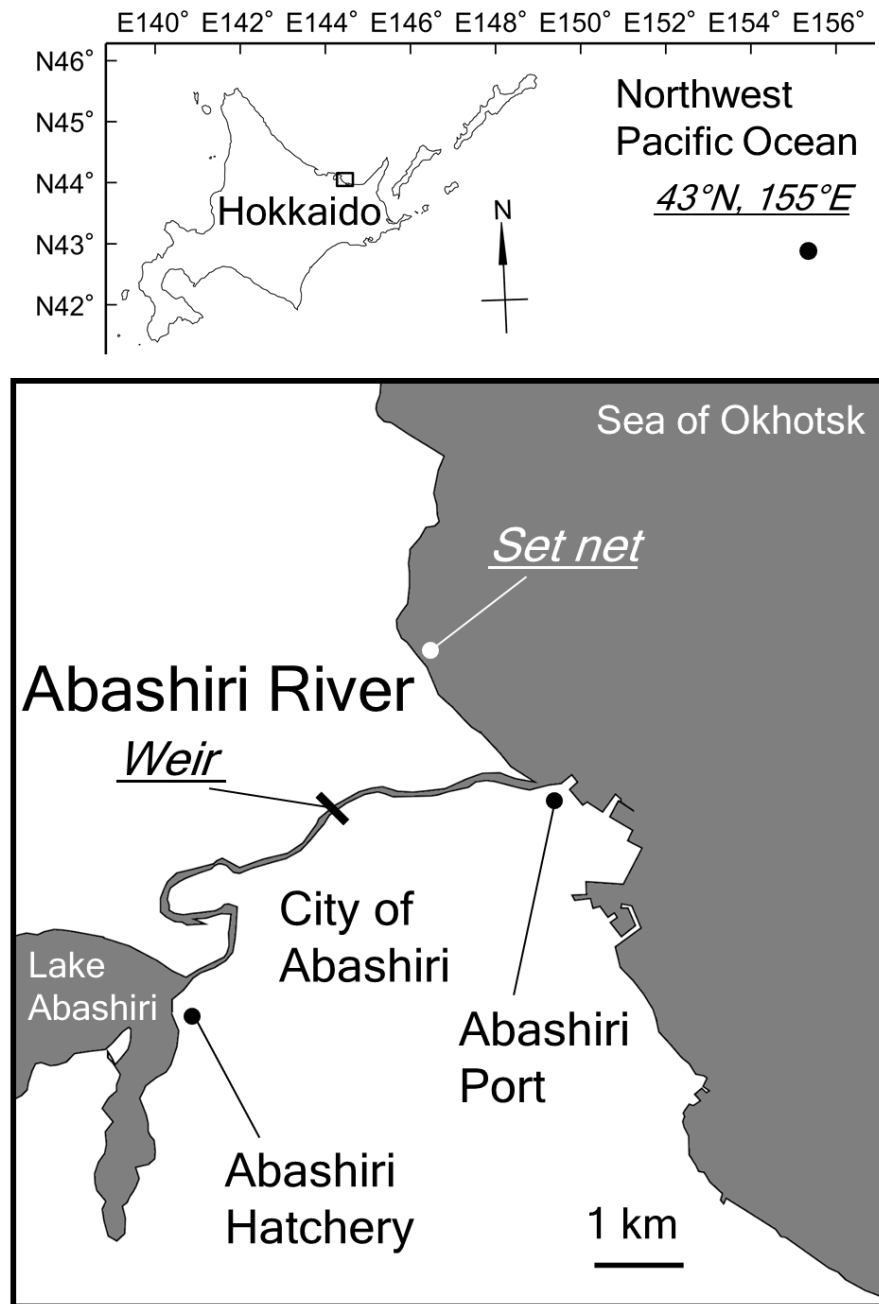


Fig. 27. Fish collection sites. Upper: Black dot indicates the area of collection of immature pink salmon in the Northwest Pacific Ocean (43°00'N, 155°00'E). Lower: The Abashiri Hatchery (maintenance of fry; 43°59'N, 144°13'E), set net off Abashiri (collection of maturing males; 44°02'N, 144°15'E), and a weir in the lower reaches of Abashiri River (collection of mature males; 44°01'N, 144°14'E) in Abashiri (eastern Hokkaido, Japan).

に精製した。NanoDrop 1000 を用いて全 RNA 濃度および純度測定を行った。全 RNA を鋳型として、2-1-1 の方法で鋳型 cDNA を合成した。RT 条件は、変性反応 30 °C 10 分、アニーリング 60 °C 60 分、伸長反応 70 °C 15 分とした。

定量的発現解析に用いる各プライマーは、3-2-2 に前述した通り作製したプライマーを用いた (Table 2)。嗅覚器官、脳各部位および脳下垂体組織からの全 RNA 抽出および精製は、2-1-1 と同様に行い、全 RNA 濃度は NanoDrop 1000 により測定した。各組織より抽出した全 RNA を鋳型として、前述の反応条件で cDNA 合成を行い、これを鋳型とした。発現解析は、3-2-3 同様に各 *snare* 遺伝子の qPCR 増幅領域を含む遺伝子断片をサブクローニングしたプラスミドの段階希釈によるプラスミドスタンダードを用い、絶対定量により行った。qPCR は、3-2-3 と同様の反応条件で行った。

4-2-3. 統計解析

定量的発現解析により得られた発現量は、平均値 $\pm$ SE で示した。統計解析は、SPSS 20.0 を用いて行い、有意水準は $p < 0.05$ とした。各データは、Shapiro-Wilk 検定により分布の正規性を確認した。比較する全データが正規分布と有意に異ならなかった場合は、一元配置分散分析 (ANOVA) の後、Tukey HSD 検定により多重比較を行った。正規分布に従わないデータが含まれた場合は、Kruskal-Wallis 検定の後に Dunn 検定により多重比較を行った。*snare* 発現の分子間の関連を推定するため、各サンプルの発現量間の Spearman の順位相関係数 (ρ) を算出した。

4-3. 結果

4-3-1. サケ回遊に伴う *snare* 遺伝子発現変化

サケ嗅房における *snap25a* 発現は、降海前・降海中幼稚魚で遡上中盤および遡上後に比べて有意に高かった (Fig. 28A)。嗅房 *snap25b* および *stx1a* 発現は、降海前・中・後で遡上後に比べて有意に高かった (Figs. 28B, C)。嗅房 *stx1b* 発現は、降海前・中・後で遡上後に比べて有意に高く、降海前では遡上中盤と比べても有意に高かった (Fig. 28D)。嗅房 *vamp2* 発現は、降海前で索餌回遊以降に比べ有意に高く、降海後では遡上後に比べ有意に高かった (Fig. 28E)。

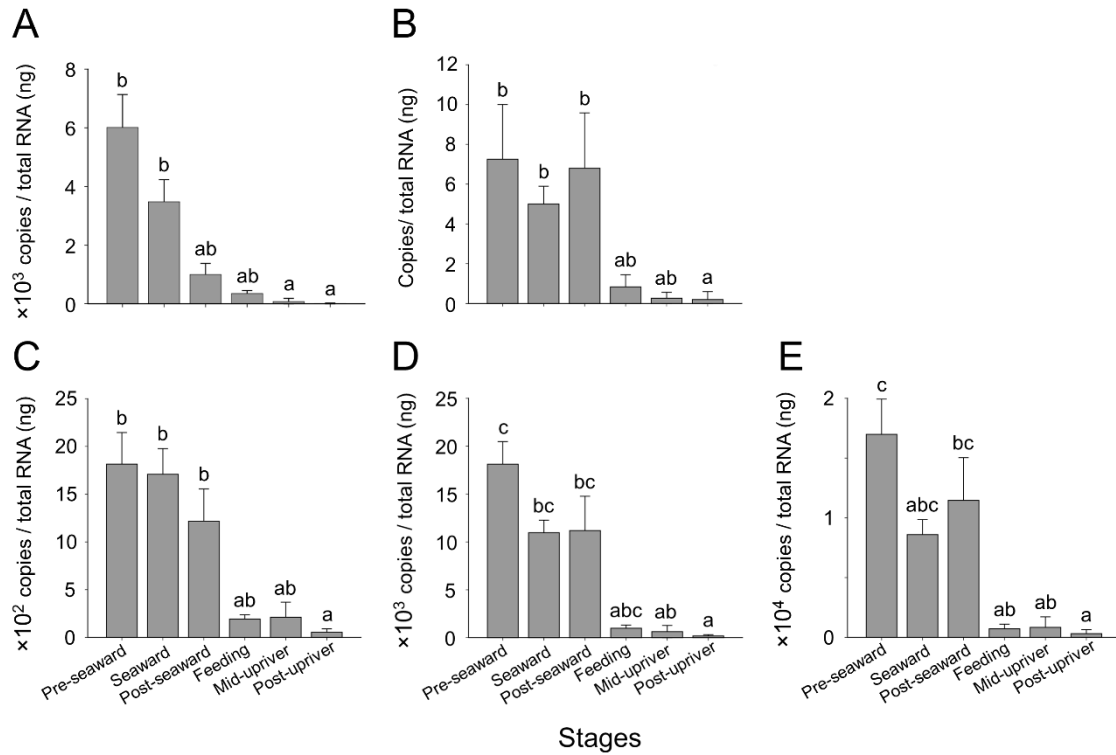


Fig. 28. Expression analyses of synaptosome-associated protein isoform 25a (*snap25a*: A) and isoform 25b (*snap25b*: B), syntaxin isoform-1a (*stx1a*: C) and isoform-1b (*stx1b*: D), and vesicle-associated membrane protein isoform-2 (*vamp2*: E) in the olfactory rosette of chum salmon during migration using quantitative real-time PCR (qPCR). Values represent the mean $\pm$ standard error (n=4-6) of copies per sample RNA (ng). Shared letters indicate no significant difference ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test).

サケ嗅球の *snap25a* 発現は、降海後と遡上中盤で遡上初期および遡上後に比べて有意に高かった (Fig. 29A)。嗅球 *snap25b* の発現量に回遊ステージ間で有意差は無かった (Fig. 29B)。嗅球 *stx1a* 発現は、降海中および遡上中盤で遡上前に比べて有意に高かった (Fig. 29C)。嗅球 *stx1b* 発現は、降海中および遡上中盤で遡上前および遡上初期に比べて有意に高く、降海後でも遡上初期に比べて有意に高かった (Fig. 29D)。嗅球 *vamp2* 発現は、降海中・後で遡上前および遡上初期に比べて有意に高かった (Fig. 29E)。

サケ終脳の *snap25a* 発現は、降海中・降海後で索餌回遊中、遡上前、遡上初期および遡上後に比べて有意に高く、降海後では降海前および遡上中盤に比べても有意に高かった (Fig. 30A)。終脳 *snap25b* 発現は、索餌回遊中および遡上後で遡上初期に比べて有意に高く、遡上後では降海期および遡上期の他のステージと比べても有意に高かった (Fig. 30B)。終脳 *stx1a* 発現は、索餌回遊中、遡上中盤および遡上後で遡上初期に比べて有意に高かった (Fig. 30C)。終脳 *stx1b* 発現は、降海中・後、索餌回遊中、遡上中盤および遡上後で遡上初期に比べて有意に高く、降海後と遡上後では遡上前と比べても有意に高かった (Fig. 30D)。終脳 *vamp2* 発現は、降海後で他の全ステージに比べて有意に高く、降海中では遡上前、遡上初期および遡上後に比べて有意に高く、降海前および遡上中盤でも遡上初期に比べて有意に高かった (Fig. 30E)。

サケ幼稚魚から成熟魚までの生活史を通した嗅房、嗅球および終脳における各 *snare* 遺伝子の発現 (Figs. 28-30) と供試魚の尾叉長および体重の相関係数および *p* 値を Table 6 に示す。サケ嗅房 *snare* 遺伝子の発現は、尾叉長および体重と負の相関を示した。サケ嗅球および終脳の *snap25a*, *stx1b* および *vamp2* 発現は、尾叉長と負の相関を示した。同様に *stx1b* および *vamp2* 発現は、体重とも負の相関を示した。嗅房および嗅球における *snare* 遺伝子の発現量は、いずれの分子間でも正の相関を示した。終脳における *snare* 遺伝子の発現量は、*snap25a* と *snap25b* 間および *snap25a* と *stx1a* 間に有意な相関が認められなかったが、他の全ての分子間では正の相関を示した。

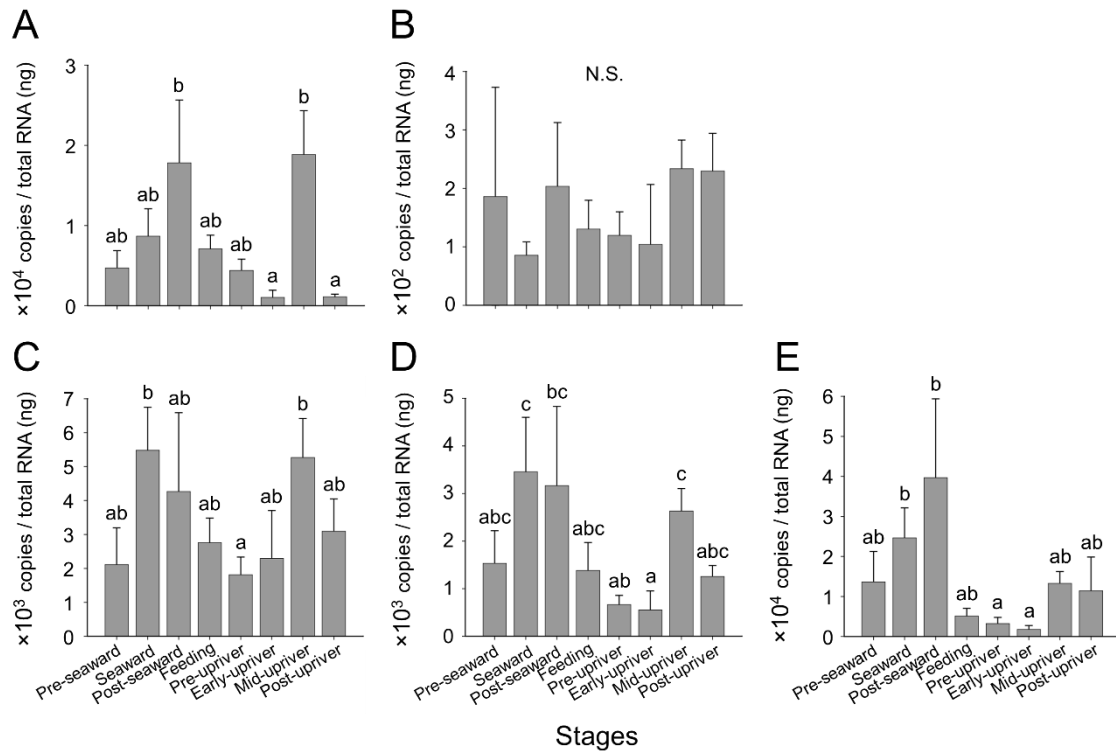


Fig. 29. Expression analyses of synaptosome-associated protein isoform 25a (*snap25a*: A) and isoform 25b (*snap25b*: B), syntaxin isoform-1a (*stx1a*: C) and isoform-1b (*stx1b*: D), and vesicle-associated membrane protein isoform-2 (*vamp2*: E) in the olfactory bulb of chum salmon during migration using quantitative real-time PCR (qPCR). Values represent the mean $\pm$ standard error (n=5-7) of copies per sample RNA (ng). Shared letters indicate no significant difference ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test).

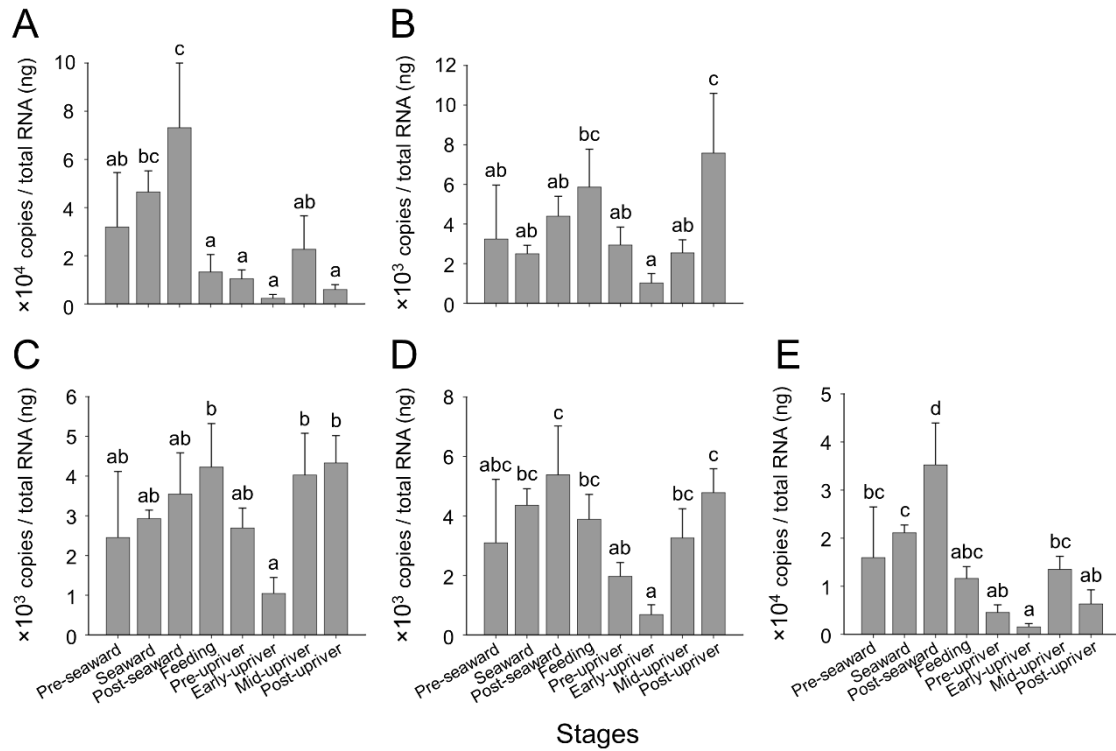


Fig. 30. Expression analyses of synaptosome-associated protein isoform 25a (*snap25a*: A) and isoform 25b (*snap25b*: B), syntaxin isoform-1a (*stx1a*: C) and isoform-1b (*stx1b*: D), and vesicle-associated membrane protein isoform-2 (*vamp2*: E) in the telencephalon of chum salmon during migration using quantitative real-time PCR (qPCR). Values represent the mean $\pm$ standard error (n=5-7) of copies per sample RNA (ng). Shared letters indicate no significant difference ($p < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference test for A, B, D, and E, and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test for C).

Table 6. Correlation coefficients of fork length (FL) and body weight (BW), and expression levels of *snap25a*, *snap25b*, *stx1a*, *stx1b*, and *vamp2* in the olfactory rosette (OR), olfactory bulb (OB), and telencephalon (Te) of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) during seaward, feeding, and homeward migrations. Spearman's rank correlation coefficient (ρ) and p values of each data set are shown in each column from the top to the bottom. Red letters indicate significant positive correlations and blue letters indicate significant negative correlations (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

		BW g	<i>snap25a</i> in OR	<i>snap25a</i> in OB	<i>snap25a</i> in Te	<i>snap25b</i> in OR	<i>snap25b</i> in OB	<i>snap25b</i> in Te	<i>stx1a</i> in OR	<i>stx1a</i> in OB	<i>stx1a</i> in Te	<i>stx1b</i> in OR	<i>stx1b</i> in OB	<i>stx1b</i> in Te	<i>vamp2</i> in OR	<i>vamp2</i> in OB	<i>vamp2</i> in Te
FL mm	ρ	.971**	-.958**	-.350*	-.579**	-.853**	.067	-.170	-.879**	-.125	-.043	-.931**	-.426**	-.388*	-.867**	-.579**	-.689**
	p value	.000	.000	.023	.000	.000	.672	.281	.000	.429	.787	.000	.005	.011	.000	.000	.000
BW g	ρ		-.936**	-.272	-.529**	-.852**	.112	-.187	-.844**	-.041	.002	-.912**	-.351*	-.367*	-.847**	-.548**	-.635**
	p value		.000	.081	.000	.000	.479	.235	.000	.799	.992	.000	.023	.017	.000	.000	.000
<i>snap25a</i> in OR	ρ			-.015	.451*	.901**	-.530**	-.363*	.933**	-.278	-.567**	.955**	.075	-.058	.902**	.328	.457**
	p value			.935	.011	.000	.002	.045	.000	.130	.001	.000	.688	.756	.000	.072	.010
<i>snap25a</i> in OB	ρ				.584**	-.035	.342*	.121	.148	.649**	.356*	.076	.789**	.376*	.053	.631**	.706**
	p value				.000	.851	.027	.447	.426	.000	.021	.684	.000	.014	.778	.000	.000
<i>snap25a</i> in Te	ρ					.435*	.009	.251	.548**	.423**	.237	.520**	.647**	.579**	.521**	.636**	.838**
	p value					.014	.956	.109	.001	.005	.132	.003	.000	.000	.003	.000	.000
<i>snap25b</i> in OR	ρ						-.584**	-.273	.889**	-.330	-.511**	.922**	-.043	.045	.927**	.328	.464**
	p value						.001	.137	.000	.070	.003	.000	.819	.809	.000	.072	.009
<i>snap25b</i> in OB	ρ							.436**	-.575**	.543**	.422**	-.570**	.444**	.243	-.540**	.388*	.160
	p value							.004	.001	.000	.005	.001	.003	.121	.002	.011	.312
<i>snap25b</i> in Te	ρ								-.394*	.194	.747**	-.338	.167	.721**	-.356*	.244	.392*
	p value								.028	.219	.000	.063	.292	.000	.049	.120	.010
<i>stx1a</i> in OR	ρ									-.092	-.408*	.957**	.179	.062	.929**	.324	.612**
	p value									.624	.023	.000	.334	.742	.000	.076	.000
<i>stx1a</i> in OB	ρ										.469**	-.256	.857**	.509**	-.264	.644**	.521**
	p value										.002	.165	.000	.001	.152	.000	.000
<i>stx1a</i> in Te	ρ											-.471**	.367*	.769**	-.428*	.284	.446**
	p value											.007	.017	.000	.016	.068	.003
<i>stx1b</i> in OR	ρ												.042	-.005	.958**	.263	.547**
	p value												.824	.978	.000	.153	.001
<i>stx1b</i> in OB	ρ													.549**	.031	.844**	.744**
	p value													.000	.868	.000	.000
<i>stx1b</i> in Te	ρ														.089	.574**	.735**
	p value														.635	.000	.000
<i>vamp2</i> in OR	ρ															.339	.569**
	p value															.062	.001
<i>vamp2</i> in OB	ρ																.707**
	p value																.000

4-3-2. サケ降河行動に伴う *snare* 遺伝子発現変化

嗅房における *snap25a*, *snap25b* および *stx1b* 発現量に降海時の降河行動を細分化したステージ間で有意差は無かった (Figs. 31A, B, D)。嗅房 *stx1a* 発現は、放流 2-3, および 12-15 日後で小型および大型降河後幼魚に比べ有意に高く、放流 9-10 日後で小型降河後幼魚に比べて高かった (Fig. 31C)。嗅房 *vamp2* 発現は、放流 12-15 日後で小型および大型降河後幼魚に比べ有意に高く、放流 2-3 日後でも小型降河後幼魚に比べ有意に高かった (Fig. 31E)。嗅球 *snap25a*, *snap25b*, *stx1a* 発現量にステージ間で有意差は無かった (Figs. 32A, B, C)。嗅球 *stx1b* 発現は、放流 2-3 日後で早期稚魚および降河前稚魚に比べ有意に高かった (Fig. 32D)。嗅球 *vamp2* 発現は、放流 2-3 日後で降河前稚魚に比べ有意に高かった (Fig. 32E)。終脳 *snap25a*, *snap25b* および *stx1b* 発現量にステージ間で有意差は無かった (Figs. 33A, B, D)。終脳 *stx1a* 発現は、放流 2-3 日後で早期稚魚、降河前稚魚および小型降河後幼魚に比べ有意に高く、放流 9-10 日後で小型降河後幼魚に比べ有意に高かった (Fig. 33C)。終脳 *vamp2* 発現は、放流 9-10 日後で小型および大型降河後幼魚に比べて有意に高かった (Fig. 33E)。

降河中サケ幼稚魚の嗅房、嗅球および終脳における *snare* 遺伝子の発現と供試魚の尾叉長、体重および肥満度の相関係数および *p* 値を Table 7 に示す。嗅球 *snap25a*, *snap25b* および *stx1b* 発現と終脳 *snap25b* 発現は尾叉長と正の相関を示した。同 *snap25s* 発現は、体重とも正の相関を示した。嗅房では、*snap25a* と *snap25b* および *stx1b* 発現, *snap25b* と *stx1b* 発現, *stx1a* と *stx1b* および *vamp2* 発現, *stx1b* と *vamp2* 発現の間に正の相関が認められた。嗅球では、全ての *snare* 遺伝子の間で発現量が正の相関を示した。終脳では、*snap25a* と *stx1s* 発現間に有意な相関が認められなかった。

4-3-3. サケ稚魚での野生魚とふ化場魚の *snare* 遺伝子発現比較

嗅房における *snare* 遺伝子の発現量にふ化場魚と野生魚間で有意差は無かった (Fig. 34)。嗅球では *snap25a* 発現のみが、ふ化場魚で有意に高かった (Fig. 35)。終脳では *snap25b* 発現のみが、野生魚で有意に高かった (Fig. 36)。発現解析に用いた供試魚の体サイズ (尾叉長と体重) および肥満度と嗅房、嗅球および終脳にお

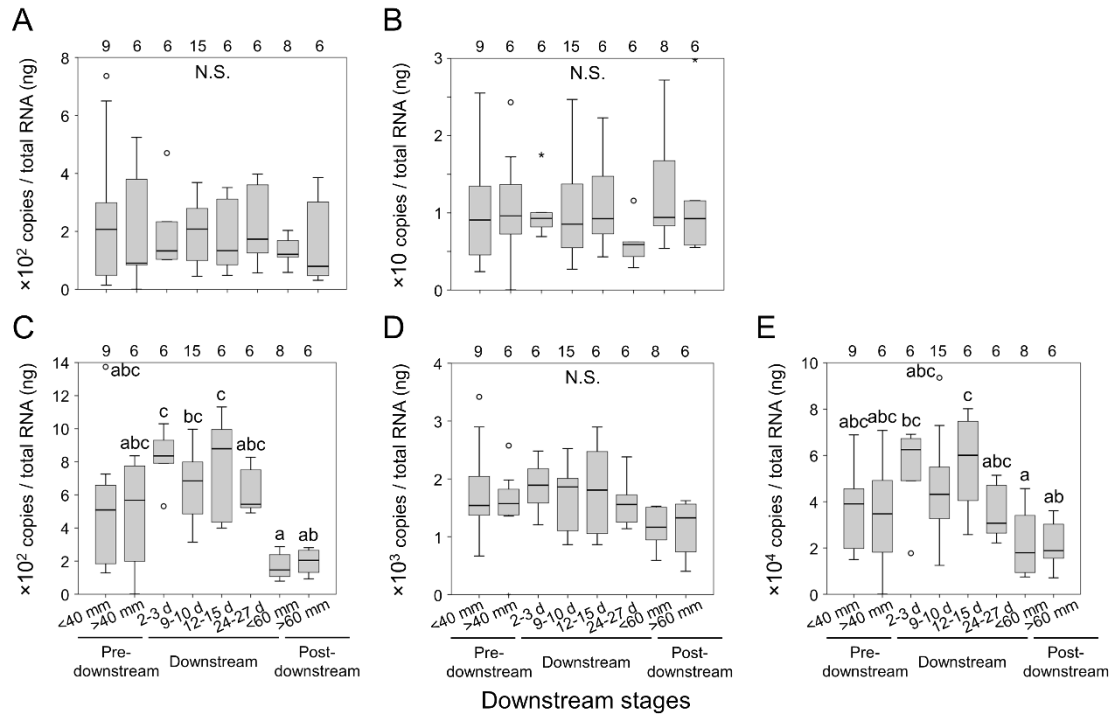


Fig. 31. Expression analyses of synaptosome-associated protein isoform 25a (*snap25a*: A) and isoform 25b (*snap25b*: B), syntaxin isoform-1a (*stx1a*: C) and isoform-1b (*stx1b*: D), and vesicle-associated membrane protein isoform-2 (*vamp2*: E) in the olfactory rosette of chum salmon during downstream migration using quantitative real-time PCR (qPCR). Numbers above each bar indicate sample number for each column. Boxes: 25-75 percentile range, bold lines: median, whiskers: minimum and maximum values exclude outliers (open circles: $< \times 1.5$ interquartile range [IQR], asterisks: $> \times 1.5$ IQR). Pre-downstream stage was divided to two substages based on FL, < 40 mm and > 40 mm. Downstream stage was divided to four substages based on days after released from hatchery, 2-3 d, 9-10 d, 12-15 d, and 24-27 d. Post-downstream stage was divided to two substages based on FL, < 60 mm and > 60 mm. Shared letters indicate no significant difference ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test for A, B, C, and D, and one-way ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference test for E).

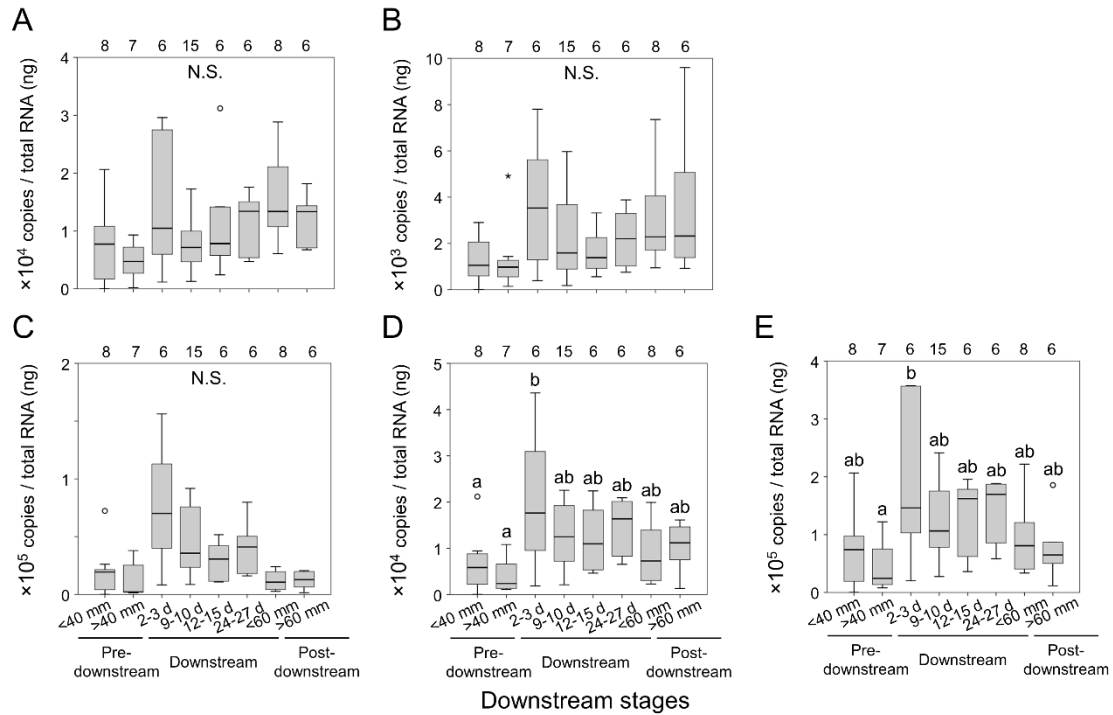


Fig. 32. Expression analyses of synaptosome-associated protein isoform 25a (*snap25a*: A) and isoform 25b (*snap25b*: B), syntaxin isoform-1a (*stx1a*: C) and isoform-1b (*stx1b*: D), and vesicle-associated membrane protein isoform-2 (*vamp2*: E) in the olfactory bulb of chum salmon during downstream migration using quantitative real-time PCR (qPCR). Numbers above each bar indicate sample number for each column. Boxes: 25-75 percentile range, bold lines: median, whiskers: minimum and maximum values exclude outliers (open circles: $< \times 1.5$ interquartile range [IQR], asterisks: $> \times 1.5$ IQR). Pre-downstream stage was divided to two substages based on FL, < 40 mm and > 40 mm. Downstream stage was divided to four substages based on days after released from hatchery, 2-3 d, 9-10 d, 12-15 d, and 24-27 d. Post-downstream stage was divided to two substages based on FL, < 60 mm and > 60 mm. Shared letters indicate no significant difference ($p < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference test for A, C, D, and E, and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test for B).

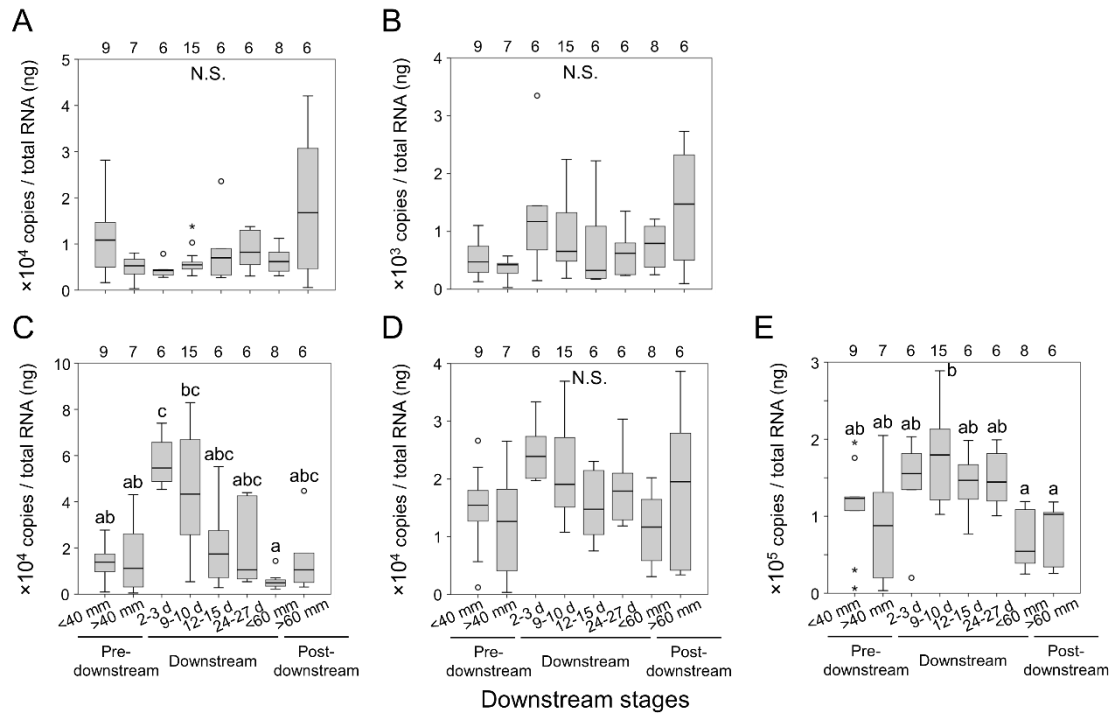


Fig. 33. Expression analyses of synaptosome-associated protein isoform 25a (*snap25a*: A) and isoform 25b (*snap25b*: B), syntaxin isoform-1a (*stx1a*: C) and isoform-1b (*stx1b*: D), and vesicle-associated membrane protein isoform-2 (*vamp2*: E) in the telencephalon of chum salmon during downstream migration using quantitative real-time PCR (qPCR). Numbers above each bar indicate sample number for each column. Boxes: 25-75 percentile range, bold lines: median, whiskers: minimum and maximum values exclude outliers (open circles: $< \times 1.5$ interquartile range [IQR], asterisks: $> \times 1.5$ IQR). Pre-downstream stage was divided to two substages based on FL, < 40 mm and >40 mm. Downstream stage was divided to four substages based on days after released from hatchery, 2-3 d, 9-10 d, 12-15 d, and 24-27 d. Post-downstream stage was divided to two substages based on FL, <60 mm and >60 mm. Shared letters indicate no significant difference ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test).

Table 7. Correlation coefficients of fork length (FL), body weight (BW), and condition factor (CF) and expression levels of *snap25a*, *snap25b*, *stx1a*, *stx1b*, and *vamp2* in the olfactory rosette (OR), olfactory bulb (OB), and telencephalon (Te) of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) during downstream migration. Spearman's rank correlation coefficient (ρ) and p values of each data set are shown in each column from the top to the bottom. Red letters indicate significant positive correlations and blue letters indicate significant negative correlations (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

		BW g	CF	<i>snap25a</i> in OR	<i>snap25a</i> in OB	<i>snap25a</i> in Te	<i>snap25b</i> in OR	<i>snap25b</i> in OB	<i>snap25b</i> in Te	<i>stx1a</i> in OR	<i>stx1a</i> in OB	<i>stx1a</i> in Te	<i>stx1b</i> in OR	<i>stx1b</i> in OB	<i>stx1b</i> in Te	<i>vamp2</i> in OR	<i>vamp2</i> in OB	<i>vamp2</i> in Te
FL mm	ρ	.924**	.204	-.003	.315*	.020	.112	.363**	.296*	-.187	.061	.027	-.167	.285*	.131	-.141	.179	-.028
	p value	.000	.109	.979	.012	.873	.381	.003	.019	.142	.637	.833	.190	.024	.304	.272	.161	.825
BW g	ρ		.430**	.043	.261*	.080	.107	.323**	.325**	-.138	.076	.079	-.144	.243	.136	-.131	.137	.024
	p value		.000	.739	.039	.534	.403	.010	.009	.282	.553	.538	.259	.055	.289	.307	.283	.854
CF	ρ			.145	-.055	.217	.074	.029	.142	.045	.078	.111	.034	.096	.035	.108	.126	.187
	p value			.257	.668	.087	.562	.821	.266	.728	.545	.389	.792	.454	.785	.398	.325	.143
<i>snap25a</i> in OR	ρ				-.067	-.284*	.559**	.100	-.151	.191	.080	-.060	.483**	.074	-.243	.130	.039	-.101
	p value				.601	.024	.000	.433	.239	.134	.534	.640	.000	.563	.055	.311	.761	.430
<i>snap25a</i> in OB	ρ					.131	.152	.748**	.218	-.021	.471**	.031	-.075	.644**	.087	-.027	.577**	-.011
	p value					.305	.233	.000	.087	.869	.000	.809	.558	.000	.496	.833	.000	.931
<i>snap25a</i> in Te	ρ						-.133	-.090	.477**	-.049	-.052	.141	-.080	-.031	.394**	-.064	-.075	.161
	p value						.300	.481	.000	.702	.684	.271	.534	.808	.001	.617	.561	.208
<i>snap25b</i> in OR	ρ							.133	.101	.172	-.017	.038	.398**	-.023	-.152	.239	-.036	-.097
	p value							.298	.433	.178	.895	.767	.001	.859	.235	.059	.782	.451
<i>snap25b</i> in OB	ρ								.378**	-.080	.541**	.193	-.196	.711**	.157	-.161	.562**	-.012
	p value								.002	.531	.000	.130	.123	.000	.218	.208	.000	.928
<i>snap25b</i> in Te	ρ									-.094	.221	.518**	-.236	.205	.598**	-.127	.060	.215
	p value									.464	.081	.000	.063	.106	.000	.322	.638	.090
<i>stx1a</i> in OR	ρ										.536**	.546**	.719**	.350**	.385**	.858**	.420**	.566**
	p value										.000	.000	.000	.005	.002	.000	.001	.000
<i>stx1a</i> in OB	ρ											.652**	.155	.901**	.550**	.459**	.891**	.549**
	p value											.000	.226	.000	.000	.000	.000	.000
<i>stx1a</i> in Te	ρ												.147	.453**	.802**	.514**	.425**	.730**
	p value												.251	.000	.000	.000	.001	.000
<i>stx1b</i> in OR	ρ													.043	.069	.692**	.128	.224
	p value													.739	.589	.000	.319	.077
<i>stx1b</i> in OB	ρ														.476**	.297**	.925**	.371**
	p value														.000	.018	.000	.003
<i>stx1b</i> in Te	ρ															.334**	.408**	.690**
	p value															.008	.001	.000
<i>vamp2</i> in OR	ρ																.448**	.518**
	p value																.000	.000
<i>vamp2</i> in OB	ρ																	.446**
	p value																	.000

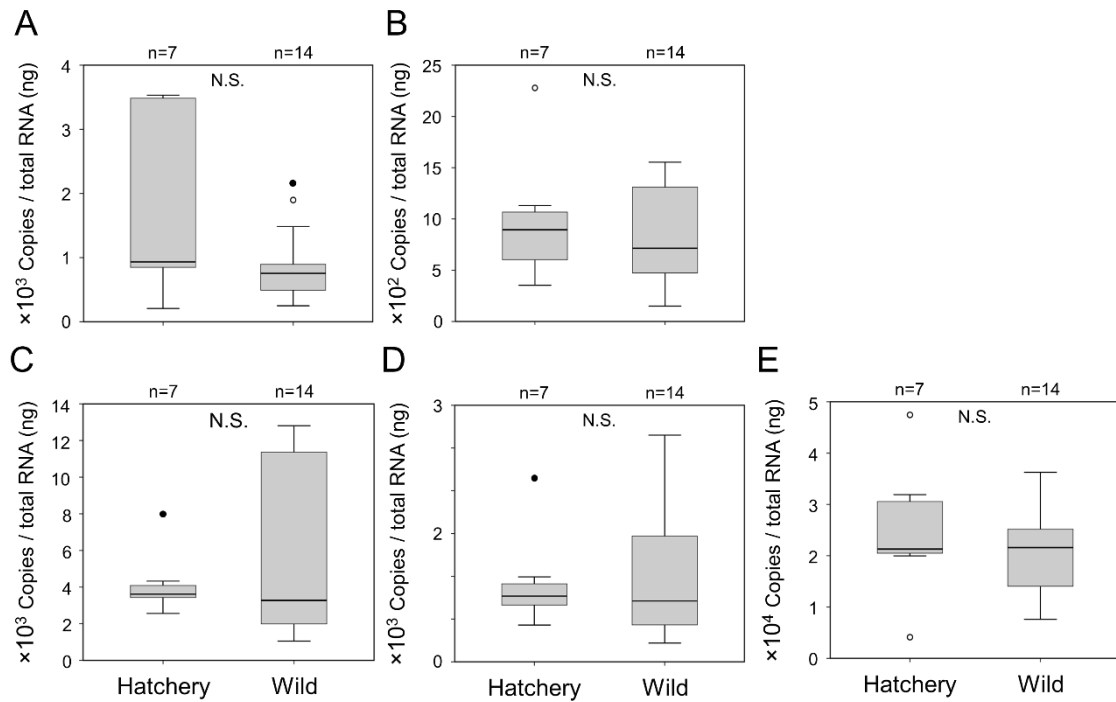


Fig. 34. Expression analyses of synaptosome-associated protein isoform 25a (*snap25a*: A) and isoform 25b (*snap25b*: B), syntaxin isoform-1a (*stx1a*: C) and isoform-1b (*stx1b*: D), and vesicle-associated membrane protein isoform-2 (*vamp2*: E) in the olfactory rosette of hatchery origin and wild juvenile chum salmon using quantitative real-time PCR (qPCR). n=7 and n=14; sample numbers of each column. Boxes: 25-75 percentile range, bold lines: median, whiskers: minimum and maximum values exclude outliers (open circles: $< \times 1.5$ interquartile range [IQR], solid circles: $> \times 1.5$ IQR). N.S. (no significance): showed no significant difference between two groups ($p > 0.05$, t -test).

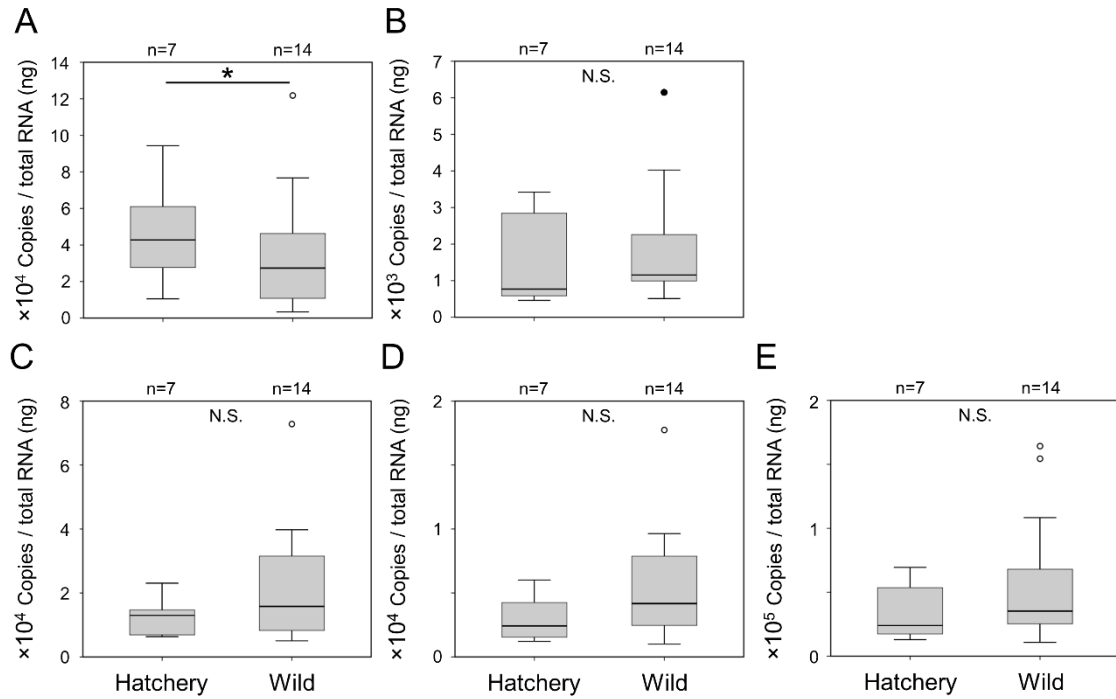


Fig. 35. Expression analyses of synaptosome-associated protein isoform 25a (*snap25a*: A) and isoform 25b (*snap25b*: B), syntaxin isoform-1a (*stx1a*: C) and isoform-1b (*stx1b*: D), and vesicle-associated membrane protein isoform-2 (*vamp2*: E) in the olfactory bulb of hatchery origin and wild juvenile chum salmon using quantitative real-time PCR (qPCR). n=7 and n=14; sample numbers of each column. Boxes: 25-75 percentile range, bold lines: median, whiskers: minimum and maximum values exclude outliers (open circles: <1.5 interquartile range [IQR], solid circles: >1.5 IQR). Asterisk indicates in each column significant difference between two groups ($p < 0.05$, t -test). Circles and asterisks indicate outliers. N.S. (no significance): showed no significant differences between two groups ($p > 0.05$).

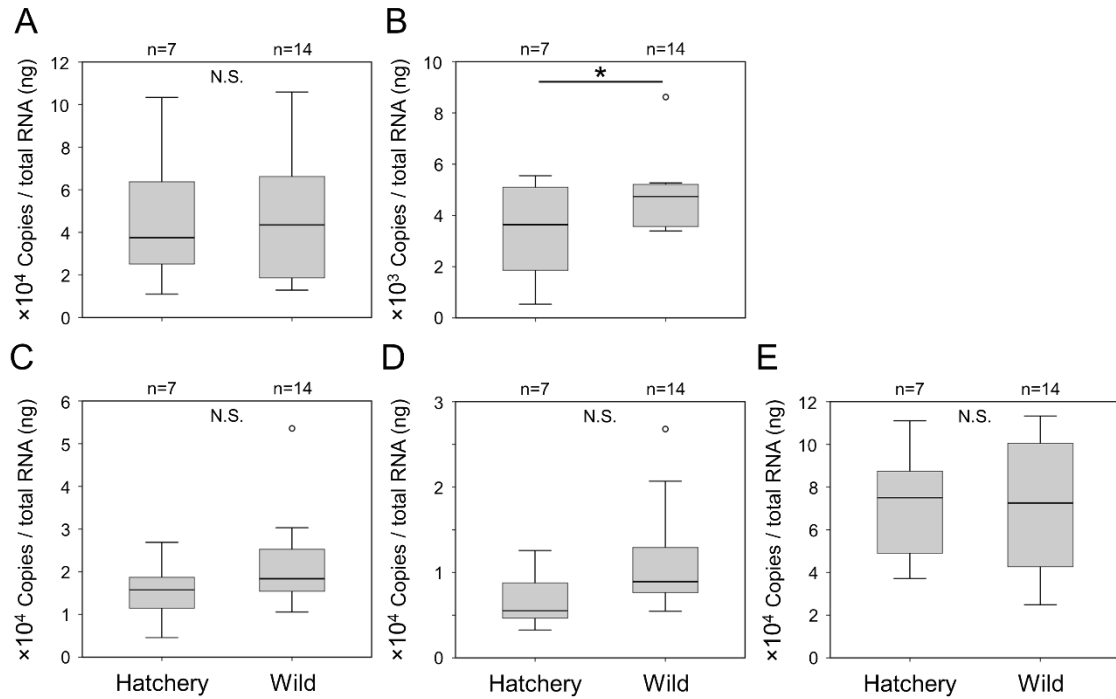


Fig. 36. Expression analyses of synaptosome-associated protein isoform 25a (*snap25a*: A) and isoform 25b (*snap25b*: B), syntaxin isoform-1a (*stx1a*: C) and isoform-1b (*stx1b*: D), and vesicle-associated membrane protein isoform-2 (*vamp2*: E) in the telencephalon of hatchery origin and wild juvenile chum salmon using quantitative real-time PCR (qPCR). n=7 and n=14; sample numbers of each column. Boxes: 25-75 percentile range, bold lines: median, whiskers: minimum and maximum values exclude outliers (open circles: $< \times 1.5$ interquartile range [IQR], solid circles: $> \times 1.5$ IQR). Asterisk indicates significant difference between two groups ($p < 0.05$, t -test). N.S. (no significance): showed no significant differences between two groups ($p > 0.05$).

ける各 *snare* 遺伝子の発現量の相関関係を Table 8 に示した。体サイズと肥満度は、各嗅神経系部位の *snare* 遺伝子の発現と有意な相関を示さなかった。嗅房の *snare* 遺伝子の発現は、*snap25b* と *stx1b* および *vamp2* 発現、*stx1a* と *stx1b* および *vamp2* 発現、*stx1b* と *vamp2* 発現が互いに正の相関を示した。嗅球の *snare* 遺伝子の発現は、*snap25a* と *snap25b* および *vamp2* 発現、*snap25b* と *stx1b* および *vamp2* 発現、*stx1a* と *stx1b* および *vamp2* 発現、*stx1b* と *vamp2* 発現が互いに正の相関を示した。終脳の *snare* 遺伝子の発現は、*snap25a* と *vamp2* 発現、*snap25b* と *stx1b* および *stx1b* 発現、*stx1a* と *stx1b* 発現が互いに正の相関を示した。

4-3-4. カラフトマス回遊に伴う *snare* 遺伝子発現変化

カラフトマス嗅房では、分析した全ての *snare* 遺伝子の発現が、降海中稚魚で高く、外洋未成熟魚と親魚で低かった (Fig. 37)。嗅房における *snare* 遺伝子の発現量は、*vamp2* が最も高く、以降、*stx1a*、*stx1b*、*snap25a*、*snap25b* の順であった。カラフトマス嗅球の *snap25a* および *stx1a* 発現は回遊ステージ間で有意差が無かった (Figs. 38A, C)。嗅球 *snap25b* 発現は、降海中稚魚が他の時期より有意に低かった (Fig. 38B)。嗅球 *stx1b* および *vamp2* 発現は、降海中稚魚で外洋未成熟魚以降に比べ有意に高かった (Figs. 38D, E)。カラフトマス終脳の *snap25a* 発現は、沿岸成熟途上魚で降海中稚魚に比べ有意に高かった (Fig. 39A)。終脳 *snap25b* 発現は、沿岸成熟途上魚と河川遡上成熟魚で降海中稚魚より有意に高かった (Fig. 39B)。終脳 *stx1a* 発現は、沿岸成熟途上魚で河川遡上成熟魚に比べ有意に高かった (Fig. 39C)。終脳 *stx1b* 発現は、有意な差を示さなかった (Fig. 39D)。終脳 *vamp2* 発現は、降海中稚魚で外洋未成熟魚および河川遡上成熟魚に比べ有意に高かった (Fig. 39E)。

カラフトマス嗅房、嗅球および終脳における *snare* 遺伝子の発現と供試魚の尾叉長および体重の相関係数および *p* 値を Table 9 に示す。カラフトマス嗅房の *snare* 遺伝子の発現量は、尾叉長および体重と負の相関を示した。嗅球 *snap25b* 発現は尾叉長および体重と正の相関を示し (Spearman's ρ : 0.594 および 0.535, $p < 0.01$)、同 *stx1b* および *vamp2* 発現は負の相関を示した。終脳 *snap25a* および *snap25b* 発現は尾叉長および体重と正の相関を示し、同 *vamp2* 発現は負の相関を示した。嗅

Table 8. Correlation coefficients of fork length (FL) and body weight (BW), and expression levels of *snap25a*, *snap25b*, *stx1a*, *stx1b*, and *vamp2* in the olfactory rosette (OR), olfactory bulb (OB), and telencephalon of hatchery-reared and wild juvenile chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Spearman's rank correlation coefficient (ρ) and p values of each data set are shown in each column from the top to the bottom. Red letters indicate significant positive correlations and blue letters indicate significant negative correlations (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

		BW g	CF	<i>snap25a</i> in OR	<i>snap25a</i> in OB	<i>snap25a</i> in Te	<i>snap25b</i> in OR	<i>snap25b</i> in OB	<i>snap25b</i> in Te	<i>stx1a</i> in OR	<i>stx1a</i> in OB	<i>stx1a</i> in Te	<i>stx1b</i> in OR	<i>stx1b</i> in OB	<i>stx1b</i> in Te	<i>vamp2</i> in OR	<i>vamp2</i> in OB	<i>vamp2</i> in Te
FL mm	ρ	.581**	.301	-.409	-.207	-.058	.140	-.123	.280	.276	.055	.233	.118	.208	.089	.023	-.149	-.256
	p value	.006	.185	.066	.369	.803	.544	.596	.219	.226	.812	.310	.610	.366	.701	.920	.518	.263
BW g	ρ		.916**	-.062	-.130	.181	.534*	-.508*	.183	.501*	-.083	-.119	.536*	-.129	.248	.486*	-.414	-.025
	p value		.000	.788	.575	.434	.013	.019	.427	.021	.720	.606	.012	.579	.278	.026	.062	.915
CF	ρ			.171	-.019	.334	.599**	-.517*	.203	.452*	-.196	-.161	.562**	-.282	.299	.523*	-.477*	.071
	p value			.457	.933	.139	.004	.016	.378	.040	.394	.486	.008	.216	.188	.015	.029	.758
<i>snap25a</i> in OR	ρ				.587**	.295	-.030	.127	.043	-.100	.025	-.044	-.048	-.108	-.164	.351	.268	.338
	p value				.005	.195	.898	.582	.854	.666	.915	.849	.836	.642	.478	.119	.241	.134
<i>snap25a</i> in OB	ρ					.217	-.390	.452*	.069	-.078	.209	-.042	-.225	.125	-.305	.112	.547*	.318
	p value					.345	.081	.040	.767	.737	.363	.858	.328	.590	.179	.630	.010	.160
<i>snap25a</i> in Te	ρ						.226	-.334	.397	-.319	-.453*	-.016	-.099	-.557**	.214	.035	-.390	.574**
	p value						.325	.139	.074	.158	.039	.947	.670	.009	.351	.880	.081	.007
<i>snap25b</i> in OR	ρ							-.497*	.095	.417	-.256	-.096	.747**	-.292	.553**	.495*	-.719**	-.274
	p value							.022	.683	.060	.263	.679	.000	.199	.009	.023	.000	.229
<i>snap25b</i> in OB	ρ								.068	.026	.405	.266	-.258	.578**	-.208	-.131	.594**	-.025
	p value								.771	.911	.068	.243	.258	.006	.366	.571	.005	.915
<i>snap25b</i> in Te	ρ									.343	.222	.758**	.160	.282	.522*	.023	-.035	.304
	p value									.128	.333	.000	.489	.216	.015	.920	.880	.180
<i>stx1a</i> in OR	ρ										.536*	.292	.851**	.481*	.479*	.535*	-.136	-.318
	p value										.012	.199	.000	.027	.028	.012	.556	.160
<i>stx1a</i> in OB	ρ											.413	.266	.896**	.234	.330	.571**	-.145
	p value											.063	.243	.000	.308	.144	.007	.529
<i>stx1a</i> in Te	ρ												.009	.497*	.440*	-.252	.110	.116
	p value												.969	.022	.046	.271	.634	.618
<i>stx1b</i> in OR	ρ													.171	.584**	.691**	-.442*	-.403
	p value													.457	.005	.001	.045	.070
<i>stx1b</i> in OB	ρ														.231	.153	.577**	-.279
	p value														.313	.507	.006	.220
<i>stx1b</i> in Te	ρ															.187	-.418	-.004
	p value															.417	.059	.987
<i>vamp2</i> in OR	ρ																-.010	-.178
	p value																.964	.440
<i>vamp2</i> in OB	ρ																	.081
	p value																	.729

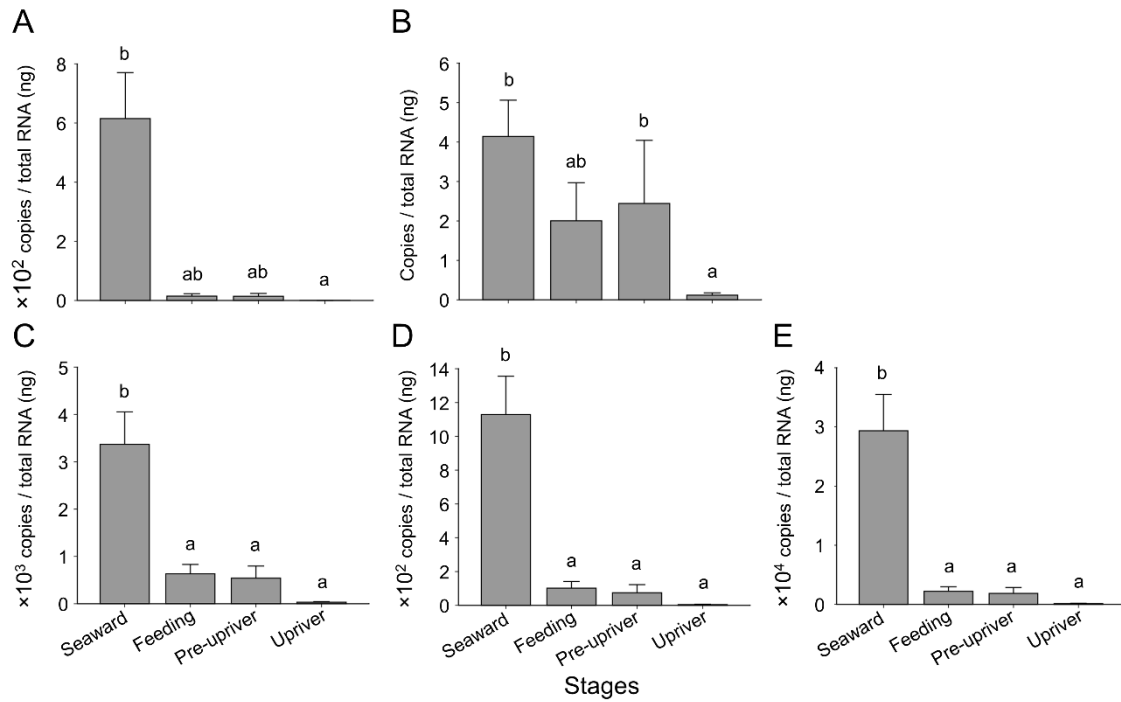


Fig. 37. Expression analyses of synaptosome-associated protein isoform 25a (*snap25a*: A) and isoform 25b (*snap25b*: B), syntaxin isoform-1a (*stx1a*: C) and isoform-1b (*stx1b*: D), and vesicle-associated membrane protein isoform-2 (*vamp2*: E) in the olfactory rosette of pink salmon during migration using quantitative real-time PCR (qPCR). Values represent the mean $\pm$ standard error (n=5-7) of copies per sample RNA (ng). Shared letters indicate no significant difference ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test for A, and one-way ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference test for B-E).

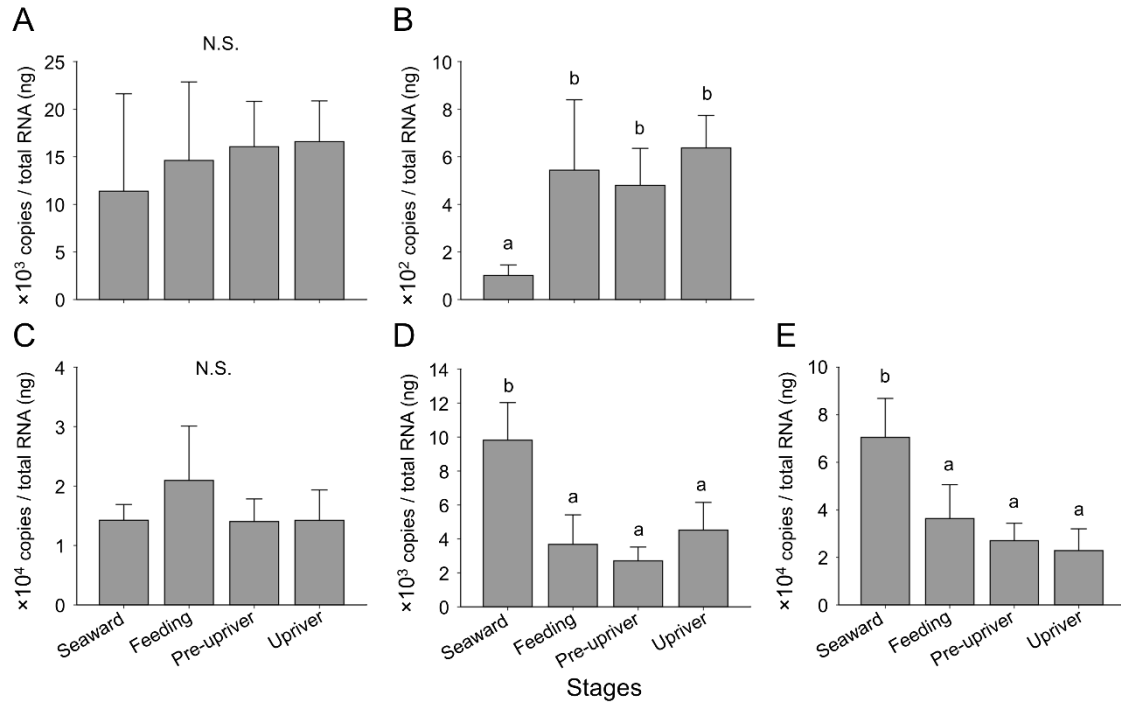


Fig. 38. Expression analyses of synaptosome-associated protein isoform 25a (*snap25a*: A) and isoform 25b (*snap25b*: B), syntaxin isoform-1a (*stx1a*: C) and isoform-1b (*stx1b*: D), and vesicle-associated membrane protein isoform-2 (*vamp2*: E) in the olfactory bulb of pink salmon during migration using quantitative real-time PCR (qPCR). Values represent the mean $\pm$ standard error (n=5-7) of copies per sample RNA (ng). Shared letters indicate no significant difference ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test for A, and one-way ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference test for B-E).

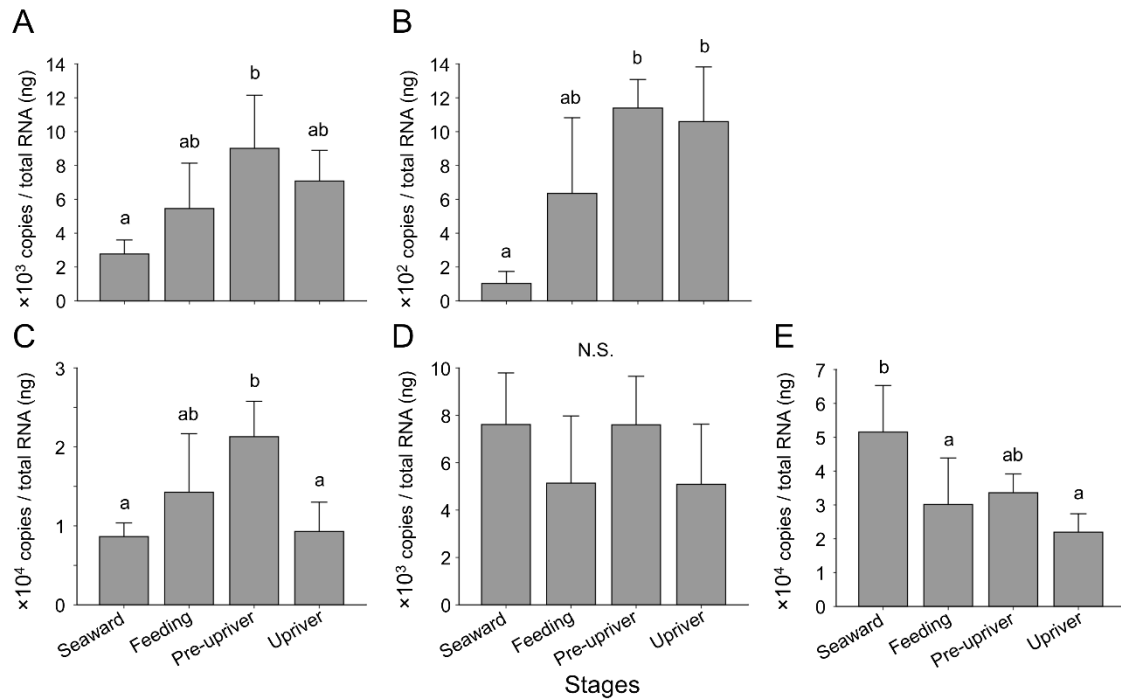


Fig. 39. Expression analyses of synaptosome-associated protein isoform 25a (*snap25a*: A) and isoform 25b (*snap25b*: B), syntaxin isoform-1a (*stx1a*: C) and isoform-1b (*stx1b*: D), and vesicle-associated membrane protein isoform-2 (*vamp2*: E) in the telencephalon of pink salmon during migration using quantitative real-time PCR (qPCR). Values represent the mean $\pm$ standard error (n=5-7) of copies per sample RNA (ng). Shared letters indicate no significant difference ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test for A and C, and one-way ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference test for B, D, and E).

Table 9. Correlation coefficients of fork length (FL) and body weight (BW), and expression levels of *snap25a*, *snap25b*, *stx1a*, *stx1b*, and *vamp2* in the olfactory rosette (OR), olfactory bulb (OB), and telencephalon of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*) during seaward, feeding, and homeward migrations. Spearman's rank correlation coefficient (ρ) and p values of each data set were shown in each column from the top to the bottom. Red letters indicate significant positive correlations and blue letters indicate significant negative correlations (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

		BW g	<i>snap25a</i> in OR	<i>snap25a</i> in OB	<i>snap25a</i> in Te	<i>snap25b</i> in OR	<i>snap25b</i> in OB	<i>snap25b</i> in Te	<i>stx1a</i> in OR	<i>stx1a</i> in OB	<i>stx1a</i> in Te	<i>stx1b</i> in OR	<i>stx1b</i> in OB	<i>stx1b</i> in Te	<i>vamp2</i> in OR	<i>vamp2</i> in OB	<i>vamp2</i> in Te
FL mm	ρ	.962**	-.864**	.342	.580**	-.744**	.594**	.715**	-.872**	-.175	.123	-.886**	-.535**	-.126	-.870**	-.738**	-.585**
	p value	.000	.000	.087	.002	.000	.001	.000	.000	.393	.549	.000	.005	.539	.000	.000	.002
BW g	ρ		-.828**	.295	.605**	-.714**	.535**	.704**	-.832**	-.205	.131	-.841**	-.600**	-.211	-.827**	-.726**	-.510**
	p value		.000	.143	.001	.000	.005	.000	.000	.316	.524	.000	.001	.301	.000	.000	.008
<i>snap25a</i> in OR	ρ			-.244	-.422*	.938**	-.612**	-.584**	.975**	.175	-.016	.978**	.540**	.335	.979**	.775**	.668**
	p value			.229	.032	.000	.001	.002	.000	.391	.938	.000	.004	.094	.000	.000	.000
<i>snap25a</i> in OB	ρ				.048	-.115	.778**	.195	-.276	.601**	.002	-.279	.194	-.018	-.231	.147	-.354
	p value				.815	.577	.000	.339	.172	.001	.993	.167	.343	.930	.255	.473	.076
<i>snap25a</i> in Te	ρ					-.279	.229	.800**	-.451*	-.165	.546**	-.450*	-.584**	.269	-.443*	-.670**	-.014
	p value					.168	.260	.000	.021	.420	.004	.021	.002	.184	.023	.000	.946
<i>snap25b</i> in OR	ρ						-.452*	-.419*	.941**	.228	.097	.926**	.469*	.389*	.943**	.702**	.599**
	p value						.020	.033	.000	.263	.636	.000	.016	.049	.000	.000	.001
<i>snap25b</i> in OB	ρ							.355	-.610**	.521**	.015	-.603**	-.099	-.254	-.579**	-.208	-.684**
	p value							.076	.001	.006	.943	.001	.631	.210	.002	.309	.000
<i>snap25b</i> in Te	ρ								-.611**	-.163	.571**	-.619**	-.718**	.285	-.605**	-.777**	-.093
	p value								.001	.426	.002	.001	.000	.159	.001	.000	.650
<i>stx1a</i> in OR	ρ									.145	-.043	.991**	.525**	.282	.984**	.763**	.645**
	p value									.479	.836	.000	.006	.163	.000	.000	.000
<i>stx1a</i> in OB	ρ										.047	.177	.442*	.123	.194	.542**	.007
	p value										.820	.388	.024	.548	.343	.004	.972
<i>stx1a</i> in Te	ρ											-.071	-.523**	.552**	-.056	-.350	.343
	p value											.731	.006	.003	.787	.080	.086
<i>stx1b</i> in OR	ρ												.538**	.288	.988**	.774**	.665**
	p value												.005	.154	.000	.000	.000
<i>stx1b</i> in OB	ρ													.086	.554**	.854**	.179
	p value													.674	.003	.000	.382
<i>stx1b</i> in Te	ρ														.299	.044	.586**
	p value														.138	.831	.002
<i>vamp2</i> in OR	ρ															.789**	.654**
	p value															.000	.000
<i>vamp2</i> in OB	ρ																.358
	p value																.073

房では、全ての *snare* 遺伝子の間で発現量が正の相関を示した。嗅球では、*snap25a* と *snap25b* および *stx1a* 発現、*snap25b* と *stx1a* 発現、*stx1a* と *stx1b* および *vamp2* 発現、*stx1b* と *vamp2* 発現の間に正の相関が認められた。終脳では、*snap25a* と *snap25b* および *stx1a* 発現、*snap25b* と *stx1a* 発現、*stx1a* と *stx1b* 発現、*stx1b* と *vamp2* 発現の間に正の相関が認められた。

4-4. 考察

サケとカラフトマスで末梢嗅覚器官である嗅房での *snare* 遺伝子の発現が、降海期の幼稚魚で顕著に高く、親魚では低値だったことは、若齢のサケにおいて嗅細胞数の増加率が成魚に比べ高いことおよび遡上期には嗅細胞の新生よりも既存の嗅細胞からのシナプスによる情報伝達が主体であることを示唆している。サケ嗅細胞は若齢魚での増加率が高く、尾叉長 342 mm を変曲点として、以降の増加は体サイズ依存的で増加率は低いことが神経解剖学的に示されている (Kudo et al. 2009)。同様に、タイセイヨウサケの数種のニオイ受容体遺伝子発現は、PST 期では高いが成魚では低いことから (Johnstone et al. 2011)、サケ類の母川刷込に必要な嗅神経系回路は降海時期までに構築されと考えられる。嗅房の *snare* 遺伝子の発現レベルが成魚では低いことは、嗅細胞数の増加率の低下と一致した変化であると考えられた。ニオイ受容体を発現する嗅細胞の細胞体は嗅房に存在し、そこから伸長する軸索は嗅球の糸球体で終末し、より上位の僧帽細胞の樹状突起とシナプス結合する (Satou 1990, Kudo et al. 1996b, Ochs et al. 2017: Fig. 1B)。そのため、嗅覚情報の一次入力に機能する *Snare* タンパクの遺伝子発現は、嗅細胞の細胞体がある嗅房で検出されと考えられる。降海時期の嗅房における *snare* 発現は成魚に比べて高く、サケ類幼稚魚期における嗅細胞数の増加に伴う嗅球糸球体層での嗅細胞軸索のシナプス増加を反映したものと考えられた。

嗅覚一次中枢である嗅球における *snare* 遺伝子の発現は、分子間で差はあるが降海期に高く、親魚の遡上中にも上昇する傾向を示した。*snap25a* および *vamp2* 発現は降海後に高く、*stx1a* および *stx1b* 発現は降海中でも高かったことから、*snare* 分子間で各回遊ステージにおいて要求される発現量が異なる可能性が考えられた。サケ類を含む真骨魚類の終脳は、嗅皮質および海馬の機能的相同領域を含み

(Yamamoto et al. 2007, Yamamoto 2009), 一部の嗅神経も終脳腹側に一次投射している (ニジマス: Hara and Zhang 1996)。また, ヒメマス親魚の終脳には母川水に反応する領域の存在が機能的核磁気共鳴画像法で明らかにされていることから (Bandoh et al. 2011), サケ類の終脳は嗅覚高次中枢としても機能すると考えられる。終脳における *snare* 遺伝子の発現は, *snap25a*, *stx1s* および *vamp2* は嗅球での発現パターンと同じく降海期に高く, 親魚の遡上中にも上昇した。一方, 終脳 *snap25b* 発現は, 索餌回遊中未成熟魚および遡上後の成熟魚で高発現だった。これは, マウスにおいて *Snap25b* は成体で主要なアイソフォームであること (Yamamori et al. 2011) と類似した結果だった可能性がある。しかしながら, サケでの両アイソフォームの発現レベルは, *snap25a* が *snap25b* より約 10 倍高いことから, げっ歯類で報告されている機能分担がサケでも同様であるかは不明である。サケ嗅覚中枢では, 遡上中や遡上後の成熟魚でも *snare* 遺伝子の発現が上昇したことから, ニオイ記憶の想起と母川識別に関連する時期の嗅覚中枢におけるシナプス伝達の活性化を示唆する結果となった。遡上中の *snare* 発現上昇は, 母川の中流まで遡上した個体で認められたことから, 河川進入後に刷込まれたニオイに接触することによる嗅覚中枢での神経活動の活性化を反映しているのかもしれない。

ラット大脳皮質および *in vitro* では, *Snap25* アンチセンスオリゴヌクレオチドによる発現抑制によりニューロン軸索伸長の障害が示されている (Osen-Sand et al. 1993)。ニホンヤモリ (*Gekko japonicus*) 再生尾の軸索伸長には *Snap25b* が関与し (Wang et al. 2012), ニワトリ網膜ではシナプス形成と同期した *SNAP25* 発現が示されている (Catsicas et al. 1991)。本研究では, サケ幼稚魚の嗅球僧帽細胞において *snare* mRNA 発現が検出されており (Figs. 13A, D, F), 嗅細胞の神経終末とシナプス結合するニューロンにおける発現が示唆されている。*in situ* ハイブリダイゼーションでは嗅房 (嗅上皮) における *snare* 遺伝子の特異的な発現シグナルは, 検出感度に問題があるのか現在のところ得られていないが, サケ幼稚魚嗅房における qPCR 解析では嗅細胞における *snare* 発現が示されている。そのため, 嗅房 *snare* 発現は嗅細胞の軸索伸長および嗅球へのシナプス形成との関連を示唆したと考えられる。一方, 嗅神経軸索の一次および二次投射を受ける嗅球と終脳では, 遡上中の成熟魚でも *snare* 遺伝子が発現上昇した。魚類では, ゼブラフィッシュ終脳に

おけるニューロン新生は成魚でも継続しており (Grandel and Brand 2013), 同種における嗅覚刺激依存的なニューロン新生も報告されている (Lindsey et al. 2014)。魚類を含む脊椎動物の中樞神経系は、発達を完了した後も可塑性を維持すると考えられている (ゼブラフィッシュ: Lindsey et al. 2014, ヒツジ [*Ovis aries*] 嗅球: Corona et al. 2018, ヒト海馬: Erikson et al. 1998)。in vitro ではあるが, *Stx1b* はマウス海馬ニューロンのアクティブゾーン保持に関連しており (Kofuji et al. 2014, Arancillo et al. 2013), SNARE/Snare 分子はシナプス可塑性や伝達効率の変化といったニューロン新生を伴わない神経可塑性の変化にも関連している。サケ親魚の嗅覚中枢における遡上中の *snare* 発現上昇は、ニューロンのさらなる新生の可能性を示すものとは考え難いが, *snare* 遺伝子の発現には神経可塑性との関連からニオイを含む外部環境の刺激も影響したと考えられる。一方, サケ類の母川回帰は、性成熟過程と密接に関連すると考えられている。サケ (シロザケ) の母川回帰では、外洋索餌回遊で十分に成長すると視床下部のサケ型生殖腺刺激ホルモン放出ホルモン (sGnRH) 系を含む視床下部-脳下垂体-生殖腺軸による制御によって性成熟が開始し (Onuma et al. 2010), 同時に嗅球や終脳腹側に細胞体がある sGnRH ニューロンは母川記憶の想起にも関与すると考えられている (Kudo et al. 1996a)。母川回帰・遡上期の成魚は、成熟過程で内的因子によって神経可塑性が高まり、ニオイを含む母川刺激を識別するために脳内の神経分子が発現上昇している可能性がある。マウスにおける GnRH 神経内分泌を SNARE 複合体が制御することから (Herde et al. 2013), サケでも Snare 分子は sGnRH 神経内分泌にも機能する可能性がある。

降河行動中のサケ幼稚魚は、区分した各降河ステージ間で体サイズの成長を反映していたが、放流 9-10 日後と同 12-15 日後の個体間には有意差が認められなかったことから、放流 9-10 日後個体が低成長であったか、同 12-15 日後個体が高成長であった、あるいはその双方であった可能性がある。嗅房での *stx1a* および *vamp2* 発現は、放流 2-3 から 12-15 日後に高く、それより長期間河川滞在した個体では減少傾向を示したことから、サケ初期生活期の末梢嗅覚器官の発達に関わる *snare* 発現上昇は降河中の一時期に限られる可能性がある。嗅球での *stx1b* および *vamp2* 発現は、降海前の低値から放流 2-3 日後の最高値へと増加し、*snap25b* およ

び *stx1a* 発現も有意差は無いものの同様の傾向を示した。終脳での *stx1a* および *vamp2* 発現も放流 2-3 から 9-10 日後で高値を示しており、嗅球と終脳における *snare* 発現の上昇は嗅覚器官よりも限られた期間である可能性がある。

供試魚の放流時期と体サイズから降河中サケ幼稚魚には、河川内での成長率の異なる個体が混在していたと考えられた。そのうち、河川滞在期間の長い個体は嗅覚中枢 *snare* 発現が低く、体サイズからも低成長率であったと考えられた。サケ放流幼稚魚の河川内での成長率は、海水移行後の生残と密接に関連している (Kaneko et al. 2019)。降河中サケ幼稚魚において、低い成長率が示唆された個体の低い *snare* 遺伝子発現は、サケ幼稚魚の成長率が遊泳のみならず中枢神経系の発達を介して生残率に影響する可能性もあることを示している。本研究の降河後相当幼魚は、人工海水で約 1 か月間飼育したため本来の降海直後の状態は反映していないが、嗅覚中枢での *snare* 発現は降河中に比べ低値であった。分析した降河中個体において、放流後日数が長い個体の嗅覚中枢 *snare* 遺伝子発現が低下傾向であり、河川滞在期間が長く *snare* 遺伝子の発現が高い個体は存在しなかった。このことから、河川下流域に滞在中に嗅覚刷込に関わるシナプス伝達関連分子のタンパク合成は完了していた可能性、または、嗅覚中枢 *snare* 発現が高水準の個体は放流後早期に海水移行した可能性が考えられた。1⁺ 齢以降のスモルト幼魚で降海するギンザケでは、PST 期前後に嗅覚刷込能が高いことが報告されており (Dittman et al. 1996)、降海期の限られた期間に刷込活性が高いことは 0⁺ 齢で降海するサケでも同様であると考えられる。銀化変態期の刷込形成は、成長ホルモン系および甲状腺ホルモン系のサージを伴う内分泌制御により神経可塑性が一時的に高まることが重要であるとされている (Dittman and Quinn 1996, Ebbesson and Braithwaite 2012)。サケの降海期は、スモルト幼魚期に比べて急速な体成長に伴ってニューロン数が増加し、同時に PST に関わる内分泌系の変化によって短期間ではあるが高い神経可塑性を示す時期であると考えられた。

snare 遺伝子の発現解析に供したふ化場および野生サケ幼稚魚の尾叉長、体重および肥満度には群間の有意差が無く、いずれの値も平均値は野生魚で低い傾向があったが両群に成長・発達状況の差は無いと考えられた。サケふ化場魚および野生魚の嗅房における *snare* 遺伝子の発現は、群間で有意差が無かった。しかしなが

ら、嗅房の *snap25a* 発現はふ化場魚で、同 *stx1a* 発現は野生魚で有意差は無いものの高い傾向があった。同程度の体サイズでは、ふ化場魚と野生魚の生育環境によって *snare* 遺伝子の発現に差は無かったが、生育環境に由来する何らかの因子が発現に影響した可能性はある。嗅球では、*snap25a* 発現はふ化場魚で野生魚に比べ高かった。*snap25a* 発現は嗅房でもふ化場魚で高い傾向があり、嗅覚一次投射に関連する何らかの因子がふ化場魚での *snap25a* 発現に影響した可能性が考えられる。一方、終脳では、*snap25b* 発現は野生魚でふ化場魚に比べ高かった。*snap25b* 発現は嗅球でも野生魚で高い傾向があったが、嗅房ではふ化場魚で高い傾向があることから、嗅覚高次中枢または嗅覚以外に関連する要因が野生魚での *snap25b* 発現に影響した可能性がある。

カラフトマス嗅房の *snare* 発現は、稚魚で高く索餌回遊期以降の成魚では低値を示したことから、サケと同様に降海期の顕著な嗅細胞増殖を反映した結果であると考えられた。一方、嗅房の *snap25b* 発現は、他の *snare* 遺伝子に比べ低い発現レベルではあるが遡上前成熟途上魚でも高値であった。また、嗅球および終脳でも他の *snare* 遺伝子と異なり *snap25b* 発現は索餌回遊期以降の成魚で高値であった。サケでも成魚における *snap25b* 発現が高い傾向は認められており、げっ歯類でも幼体に比べ成体で *Snap25b* 発現が高いとする報告とも一致すると考えられた (Bark et al. 1995)。嗅球での *stx1b* および *vamp2* 発現は、嗅房と同様に稚魚で高かったことから、サケ嗅球での発現と類似した。終脳では、*snap25s* および *stx1a* 発現が遡上前成熟途上魚で上昇したことから、回帰時の母川識別に関連した発現変動を示したと考えられる。*snap25a* と *stx1a* は、遡上中成熟魚では発現が低下傾向を示すのに対し、*snap25b* 発現は高値を維持し、*stx1b* 発現には有意差が無かった。終脳での *vamp2* 発現は、稚魚で高く成魚では低いことから、嗅球と同様の発現変動であり、サケとも類似した。カラフトマス終脳における *snare* 遺伝子の発現は、アイソフォームによって異なる発現変動であった。終脳 *snap25a*、*snap25b* および *stx1a* 発現は沿岸の成熟途上魚で高く、母川探索との関連が示唆された。一方、終脳 *vamp2* 発現は、成魚の各ステージでは低いことからサケでの発現パターンと類似していた。サケは、3～10 齢までと幅広い成熟年齢が報告されており、主群のみでも 4～6 齢と幅がある (Salo 1991, 宮腰 2014, Quinn 2018)。一方、カラフトマス

の成熟年齢は、2 齢でほぼ固定されているため (Heard 1991), 海洋における索餌回遊期間は 0⁺ 齢春季から 1⁺ 齢初夏までと短い。サケに比べ短期間に成長するカラフトマスでは、沿岸回帰個体は性成熟の途中であるが成長期の特徴もまだ残っている状態であると考えられる。母川回帰中のサケ類は、沿岸域において河川水由来の塩分変化や母川水のニオイを含む化学的な環境の変化といった多様な外部環境の変化に曝される。また、母川識別のために嗅覚を用いるのは、主に沿岸域から河川遡上中であると考えられている (Wisby and Hasler 1954, Bett and Hinch 2016)。母川に入る前のサケは、沿岸域において海水温により遊泳層を決定していることから (Kitahashi et al. 2000, Tanaka et al. 2005), 外部環境の刺激を受容して行動を変化させていることが予想される。カラフトマス終脳での *snare* 発現は、サケ嗅球および終脳 *snare* 発現の遡上中における上昇と同様に、母川回帰時に経験する体内外の環境変化の影響を反映した可能性も考えられる。

サケおよびカラフトマスの幼稚魚から成魚までの主要な回遊ステージを比較した解析では、嗅房、嗅球および終脳での各 *snare* 遺伝子の発現量は互いに正の相関を示したことから (Tables 6-8), *snare* 遺伝子の発現がほぼ同調していることが分かった。サケおよびカラフトマス嗅房における *snare* 遺伝子の発現量は、尾叉長および体重と負の相関を示したのに対し (Tables 7, 9), 降河中のサケ幼稚魚嗅房 *snare* 発現と体サイズは有意な相関を示さなかった (Table 8)。このことから、嗅房 *snare* 発現と体サイズの関連は、稚魚期に比べ 10 倍以上の体サイズである成魚での低い発現量によって得られたと考えられた。

第5章 Snare 制御因子の発現

5-1. 背景と目的

第3, 4章でのサケおよびカラフトマス嗅神経系における *snare* 遺伝子の発現解析により, サケ類の嗅覚刷込および記憶想起と Snare 分子の関連が示唆された。しかしながら, *snare* 遺伝子の発現変化は, 特に幼稚魚期の発現上昇が刷込形成と嗅神経系の成長のどちらを反映したものか明確には区別できていない。また, 成熟魚で *snare* 遺伝子の発現が低かったことは, 成熟ニューロンにおける Snare タンパクの安定性とも関連していると考えられた。本章では, シナプス前膜において Snare 複合体の形成を制御し, 機能的な SNARE タンパクの保持に関わる Snare 制御因子に着目した。UNC18-1 (uncoordinated-18-1) は, シナプス前膜アクティブゾーンにおいて UNC13-1 (uncoordinated-13-1) の存在下で STX1 が速やかに SNARE 複合体を形成可能な状態を保持する機能がある (Dulubova et al. 1999, Richmond et al. 2001; Fig. 2B)。UNC18-1 は, N-末端側から Domian (d) 1, d2a, d3 および d2b の各ドメインからなる分子量 67 kDa の足場タンパク (scaffold protein) である (Hata et al. 1993, Misura et al. 2000, Burkhardt et al. 2008)。UNC13-1 は, N-末端側から C2A, CaM, C1, C2B, MUN および C2C の各ドメインからなる分子量 196 kDa の足場タンパクであり (Brose et al 1995), 哺乳類では4つのアイソフォームからなる MUNC13 ファミリーを構成する (Dittman 2019)。シナプトフィジン (SYP) は, シナプス小胞膜上で VAMP2 と結合する分子量 38 kDa の小胞タンパクであり (Wiedenmann and Franke 1985, Jahn et al. 1985, Edelmann et al. 1995), ゼブラフィッシュ初期発生時の網膜シナプスリボンの形成に関与し (Almers and Chen 2005)。マウスの環境エンリッチメント試験において大脳皮質, 海馬および小脳でのタンパク発現が増加することが報告されている (Lambert et al. 2005)。しかしながら, サケ科魚類における Snare 制御因子の発現を解析した例は全く無く, 嗅覚刷込・想起時との関連および発現動態も不明である。本章では, Snare 制御因子として, シナプス前膜アクティブゾーンで Stx1 の保持と Snare 複合体形成に関わる Unc18-1 および Unc13-1 に加え, シナプス小胞膜上で Vamp2 と結合している Syp について, サケ嗅神経系における mRNA 発現

および回遊に伴う発現変化を明らかにすることを目的とした。

5-2. 材料と方法

5-2-1. 供試魚

snare 制御因子の cDNA クローニングには、第 2 章 2-2-1 の項目で示したふ化場から供与を受けたサケ幼稚魚を用いた。炭酸ガス水で不動化・魚体測定した後、嗅覚中枢組織を剖出して 30 個体分をプールして標本とした。組織より抽出・精製した全 RNA より得た poly (A)⁺ RNA を鋳型として一本鎖 cDNA を合成した。サケ嗅覚器官、脳各部位および脳下垂体における *snare* 制御因子の発現解析には、2020 年春季に遊楽部川で採集したサケ幼稚魚 (尾叉長: 49.1 ± 0.36 mm, 体重: 0.78 ± 0.03 g) を用いた。サケの回遊に伴う *snare* 制御因子の mRNA 発現変化の解析には、第 4 章で用いた各回遊ステージのサケの試料を用いた。*unc13-1* 発現の局在性を解析するために用いた供試魚には、第 3 章で用いた遊楽部川系サケ幼稚魚を用いた。炭酸ガス水により不動化・魚体測定した後、断頭した頭部を 4% PFA で固定し、解析まで 4°C にて 70%エタノール中に保管した。

5-2-2. オリゴヌクレオチド

サケ *snare* 制御因子の cDNA クローニングに用いるフォワードおよびリバース側の RT-PCR プライマーは、NCBI に登録されているサケ科魚類のゲノム由来の塩基配列を参照して Primer 3 Plus および Multiple Primer analyzer を用いて設計した (Table 10)。*unc13-1* はニジマス *unc13-1* (XM036978043.1) 4767-4786 塩基配列部位に、*unc18-1* はタイセイヨウサケ *unc18-1* (XM014128369.1) 21-768 塩基配列部位に、*syp* はギンザケ *syp* (XM031794857.1) 78-1009 塩基配列部位にそれぞれ相当する増幅産物を得られるよう設計した。qPCR 解析に用いるフォワードおよびリバース側プライマーは、5-2-4 で得られたサケ *snare* 制御因子の塩基配列および他のサケ科魚類の相当する領域の配列を参照して作製した。

5-2-3. cDNA クローニング

足場タンパク *unc13-1* および *unc18-1* とシナプス小胞タンパク *syp* の cDNA

Table 10. Primer sets used in RT-PCR to cDNA cloning of scaffold protein uncoordinated 13 isoform 1 (*unc13-1*) and uncoordinated 18 isoform 1 (*unc18-1*) and synaptophysin (*syp*) in chum salmon, *Oncorhynchus keta*. Primer sets used in real-time PCR of *unc13-1*, *unc18-1*, and *syp* were showed with beginning small “s” indicates “salmon”. F: forward primer, R: reverse primer.

Primer	Sequence	Source	Nucleotide position
UNC13-1-F	5'-AGCAACCTGACGCTGTTTGC-3'	XM036978043.1	4767–4786
UNC13-1-R	5'-TGTGCCCACCTCGTTACTGA-3'	XM036978043.1	5476–5495
UNC18-1-F	5'-GCACATTCGGTCGAGCAGAGAA-3'	XM014128369.1	21–43
UNC18-1-R	5'-TGGTGGGGTCATCAGCCTTGTA-3'	XM014128369.1	707–768
SYP-F	5'-TCTCTTATCAACGAGCAAGGCG-3'	XM031794857.1	78–100
SYP-R	5'-GCCTCCACACTTCCTCTTTCCTC-3'	XM031794857.1	987–1009
sUNC13-1-F	5'-TTGGGAGGGTGAAGCTTGCTT-3'	This study	—
sUNC13-1-R	5'-TCACGACCCATGTGCTCCTTT-3'	This study	—
sUNC18-1-F	5'-AGAGCCGTGCTTCCAAATCCA-3'	This study	—
sUNC18-1-R	5'-AAGGCATCCGGGTTGTCCAAA-3'	This study	—
sSYP-F	5'-TGGCGTGACGTGTGTGTTCA-3'	This study	—
sSYP-R	5'-CCAAAGCAGACGGAGGTGTTGA-3'	This study	—

クローニングには、上記のサケ幼稚魚嗅覚中枢 cDNA を鋳型に用いて RT-PCR を行い、増幅産物を速やかに TA クローニングに供した。RT-PCR 条件は、プレサイクル加熱 94 °C 3 分, 35 サイクルの増幅反応 (熱変性 94 °C 30 秒, アニーリング 64.5-69 °C 30 秒, 伸長 72 °C 1 分), 伸長反応 72 °C 10 分とし、サーマルサイクラーを用いて行った。アニーリング温度は、UNC13-1-2F および UNC13-1-1R は 65.5 °C, UNC18-1-1F および UNC18-1-1R は 68.5 °C, SYP-2F および SYP-2R は 65.5 °C の各温度とした。2-2-4 同様に TOPO ベクターに増幅産物を組み込み、プラスミドを抽出精製した。

5-2-4. 塩基配列解析

シーケンシングは、第 2 章の 2-2-1 同様に、DNA シーケンサー (PRISM 3730 DNA analyzer) および BigDye Terminator v3.1 を用いて行った。シーケンシングのプロトコルは、RapidSeq POP7 v3 および 3130KB POP7 v3 にて行った。取得した配列情報の解析には、Sequence Scanner 2, ApE v2.0.47 および MEGA v10 を用い、NCBI の遺伝子情報データベースを参照した。アミノ酸配列の系統解析では、マルチプルアラインメントは MEGA に内蔵されている ClustalW により行い、系統樹は近隣結合 (N-J) 法により作成した。サケ *snare* 制御因子の演繹アミノ酸配列の相同性解析および分子系統解析に用いた他種の配列情報を以下に記載する。Unc13-1 には、ギンザケ Unc13-1 (XP031688711.1, XP031693931.1), ニジマス Unc13-1 (XP036833934.1, XP036833938.1), ゼブラフィッシュ Unc13-1 (XP009302357.2), マウス UNC13-1 (XP017168367.1) およびヒト UNC13-1 (XP011526112.1)。Unc18-1 には、タイセイヨウサケ Unc18 (XP013983844.1), ノーザンパイク Unc18 (XP010875953.1), ゼブラフィッシュ Unc18 (NP001020353.1), マウス UNC18 (NP001107041.1) およびヒト UNC18 (NP001027392.1)。Syp には、ギンザケ Syp (XP031650717.1), マスノスケ Syp (XP024261864.1), ニジマス Syp (XP021472677.1), ゼブラフィッシュ Syp (NP001137449.1), アフリカツメガエル Syp (NP001080942.1), ニホンヤモリ Syp (XP015270908.1), マウス SYP (NP033331.2) およびヒト SYP (NP003170.1)。

5-2-5. 定量的発現解析

取得したサケ *snare* 制御因子の塩基配列をもとに、qPCR プライマーを設計し (Primer 3 Plu), 発現解析を行った。qPCR には、FastStart Essential DNA Green Master Mix および Light Cycler Nano を用い、反応条件は、プレサイクル加熱 95 °C 10 分、45 サイクルの増幅反応 (熱変性 95 °C 30 秒, アニーリング 30 秒, 伸長 72 °C 1 分), 融解曲線分析 60-97 °C (+0.1 °C/秒) とした。アニーリング温度は、*unc13-1* は 68 °C, *unc18-1* と *syp* は 69 °C とした。qPCR に使用したプライマー配列およびプライマーの作製に参照した配列の情報は、Table 10 に示した。

5-2-6. *in situ* ハイブリダイゼーション

サケ *unc13-1* subtype1 の遺伝子断片をサブクローニング後のプラスミドを制限酵素 *Bam*HI または *Xho*I により直鎖化した DNA を鋳型として、Digoxigenin (DIG) RNA Labeling Mix, SP6 および T7 ポリメラーゼを用いてセンス鎖およびアンチセンス鎖の DIG 標識サケ *unc13-1* cRNA プローブを作製した。*in situ* ハイブリダイゼーションの手順は、第 3 章 3-2-4 の項と同様に実施し、*unc13-1* mRNA シグナルの観察および写真撮影を行った。

5-3. 結果

5-3-1. サケ *snare* 制御因子の塩基配列

サケ幼稚魚嗅覚中枢を用いた cDNA クローニングにより、サケ *unc13-1* の部分 CDS の 2 つのサブタイプ (*unc13-1* subtype1: 689 bp, 登録申請中, *unc13-1* subtype2: 683 bp, 登録申請中) と *unc18-1* の部分 CDS の 2 つのサブタイプ (*unc18-1* subtype1: 664 bp, 登録申請中, *unc18-1* subtype2: 664 bp, 登録申請中) および *syp* 全 CDS の 3 つのサブタイプ (*syp* subtype1: 886 bp, 登録申請中, *syp* subtype2: 887 bp, 登録申請中, *syp* subtype3: 887 bp, 登録申請中) の塩基配列を得た。

得られたサケ *unc13-1* の CDS 部分配列は、ニジマス *unc13-1* (XM36978043.1) の 4787-5475 塩基配列部位に相当し、部分配列内での比較ではあるが高い塩基配列相同性 (91.0%) を示した (Fig. 40)。ニジマスを含むサケ科魚類 *unc13-1* との相同性から、一部ではあるがサケ *Unc13-1* 演繹アミノ酸配列を推定した。ニジマス *Unc13-*

1 アミノ酸配列 (XP036833938.1, 全 1839 アミノ残基) のうち 1498-1726 アミノ酸配列部位に相当し, アラニン 1 残基の欠損がある 228 アミノ残基のサケ *Unc13-1 subtype1* 演繹アミノ酸部分配列が推定された。サケ *Unc13-1 subtype1* 演繹アミノ酸部分配列は, それぞれ他種 UNC13-1/*Unc13-1* の該当するアミノ酸配列部位と, 91.9 および 99.6% (ニジマス: XP036833934.1, XP036833938.1), 90.1 および 90.0% (カワカマス: XP034147462.1, XP034147463.1), 78.5% (マウス: NP001025044.2) および 79.3% (ヒト: XP001073890.2) の相同性を示した。サケ *Unc13-1 subtype2* 演繹アミノ酸部分配列は, ニジマス *Unc13-1* のうち 1498-1726 アミノ残基に相当し, 3 残基の欠損がある 226 アミノ残基であり, それぞれ他種 UNC13-1/*Unc13-1* の該当するアミノ酸配列部位と, 90.7 および 98.3% (ニジマス: XP036833934.1, XP036833938.1), 89.5 および 90.2% (カワカマス: XP034147462.1, XP034147463.1), 77.3% (マウス: NP001025044.2) および 78.1% (ヒト: XP001073890.2) の相同性を示した。これらの配列には, Munc13 homology domain (MHD) の C-末端側の一部 (1-114 アミノ酸配列部位) および C2C ドメインの N-末端側の一部 (170-299 アミノ酸配列部位) が含まれており, 該当部分の配列は魚類間では良く保存されていた。サケ *Unc13-1* 演繹アミノ酸配列でも, 哺乳類 UNC13-1 に対して他の魚類 *Unc13-1* に欠損が生じた領域 (ヒト UNC13-1 の 1442-1454 アミノ酸配列部位) が同様に欠損していた。比較に用いた魚種では, MHD と C2C の両ドメイン以外の部位でも哺乳類 UNC13-1 に対して少なくとも 19 残基の挿入の有無で 2 型が生じていたが, 推定されたサケ *Unc13-1* は, 2 つのサブタイプともに挿入が無いサブタイプであった。qPCR 解析では, *unc13-1 subtype1* を元にプライマーを設計したが, フォワード側プライマー (21 mer) の該当配列における *subtype2* との差は 5'-末端側の 2 塩基のみであり, 両サブタイプを検出すると考えられた。*in situ* ハイブリダイゼーションのプロープについても, 両サブタイプを区別しないものと考えられた。

タイセイヨウサケ *unc18-1* (XM014128369.1) 43-706 塩基配列部位に相当し, 高い相同性を示す (98.6 および 98.5%) 2 型のサケ *unc18-1* の CDS 部分塩基配列を得た (UNC18-1-F および UNC18-1-R; 664 bp)。この塩基配列には, 5'-UTR が含まれていたことから, タイセイヨウサケを含むサケ科魚類 *unc18-1* 転写開始位置に基づいて, 一部ではあるがサケ *Unc18-1* 演繹アミノ酸配列を推測した。タイセイヨ

	Munc13 homology domain (MHD)	
Unc13-1 Chum salmon subtype1	KICEKTVLKRVLKELWKLVMNTMEKTI VLPPLTDQTM I	
Unc13-1 Chum salmon subtype2		
Unc13-1 Rainbow trout variant X1		
Unc13-1 Rainbow trout variant X5		
Unc13-1 Coho salmon	R.....	
Unc13-1-like Coho salmon	MWVCCLR· I FSNSTVSVNQSDCGDR I LPEVLTNVLSLQ	
Unc13-1 Northern pike variant X1	I.....S.....F.....SV·	
Unc13-1 Northern pike variant X2	I.....S.....F.....SV·	
Unc13-1 Zebrafish	F.....	
UNC13-1 Mouse	GTLLRKHGKGLEK	
UNC13-1 Human	GNLLRKHGKGLEK	
Munc13 homology domain (MHD)		
GRVKLACHSDGTL I SNAAKQLGQLSKI KEHMGREEAKALSPKQCAV I ELALDT I KQYFHAGGVGLKKTFL E		
.....		
.....		
.....		
DQT·.....		
.....		
.....M·F.....E.....L.....V.....T.....M.....		
.....M·F.....E.....L.....V.....T.....M.....		
.....F.....E.....L.....V.....		
.....PS.....M·F.....E.....L·D·V.....S·T.....V.....		
.....PS.....M·F.....E.....L·D·V.....S·T.....V.....		
Munc13 homology domain (MHD)		
KSPDLLSLHY LSLYTQATDKL	I KTFVSSQNAQ	GSGVDDAVGEVSIHVEIFTH
.....A.....		
.....A.....	VFGGKGV RFTASEDVYPEK·	
.....A.....		
.....A.....	I·	
.....A.....		
.....K·A.....H.....	·RK·L.....I HGGKGVRYTLNEDTIPEK····EEPI···VM·····	
.....K·A.....H.....	·RK·L.....I HGGKGVRYTLNEDTIPEK····EEPI···VM·····	
.....Q·R·A.....	·RK·L·HTQVHGGKGVRYTSSSEDVYPDKP····E·····CMT·····ND	
.....Q·R·A.....L·	·····QT·S·····E·P·····V·····L·····	
.....Q·R·A.....L·	·····QT·S·····L·E·PV·····V·····L·····	
C2C domain		
PNTGEH	KVTVKVVAANDLRWQT TGVFRPFVEI Y I I GPHLADKKRKYATKSKNNSYAPKYNETFTYT	
.....E.....		
.....		
.....		
.....	T.....	A
.....		
.....I·R.....IK·Q·I.....V·L.....S.....F.....WS·F.....Q··		
.....I·R.....IK·Q·I.....V·L.....S.....F.....WS·F.....Q··		
.....G·RI.....S.....Q·I.....V·F·Y·S.....F.....WS·FA·S·Q·V		
.....G·Q.....K·S·I.....I·VN·V·Q·S.....F.....W.....S·QFS		
.....G·S·I.....K·S·I.....I·VN·V·Q·S.....F.....W.....S·QF·		

Fig. 40. Alignment of partial deduced amino acid sequences of uncoordinated-13 isoform-1 (Unc13-1) in chum salmon, *Oncorhynchus keta* and other vertebrates. Dots correspond to residues identical to chum salmon Unc13-1 subtype 1 (登録申請中). Boxes indicate partial Munc13 homology domain (MHD; 1-114 amino acid position) and partial C2C domain (170-299 amino acid position). Sequence information on the UNC13-1/Unc13-1 of other vertebrates is shown in section 5-2-3.

ウサケ *Unc18-1* アミノ酸配列が 595 アミノ残基のところ, 今回得られたサケ *unc18-1* 塩基配列からは, N-末端のメチオニンから 195 アミノ残基の演繹アミノ酸部分配列が推測された。また, サケ *unc18-1* subtype1 および subtype2 の塩基配列は, 該当する領域では 1 塩基の同義置換であった (365 アデニン→グアニン)。この置換は, qPCR プライマーの設計領域外のため qPCR 解析では区別しなかった。同演繹アミノ酸配列は, タイセイヨウサケ, カワカマス, ゼブラフィッシュ, マウス およびヒト *UNC18-1/Unc18-1* の該当するアミノ酸配列部位と 99.0, 98.0, 94.4, 86.2 および 86.2%の相同性を示した。同演繹アミノ酸配列には, シナプス伝達および分泌に関わる Sec1 モチーフ (29-193 アミノ酸配列部位) が保存されていた (Fig. 41)。

ギンザケ *syp* (XM031794857.1) 101-986 塩基配列部位に相当し, 5'-および 3'-UTR の一部を含むサケ *syp* の全 CDS 塩基配列を得た (*SYP-F* および *SYP-R*; 886 および 887 bp)。サケ *syp* subtype1 塩基配列は, ギンザケ *syp* の該当する塩基配列部位と 99.0%の相同性を示した。サケ *syp* には, *syp* subtype1 に対して 1 塩基の挿入を含む 7 塩基の変異がある *syp* subtype2 (99.2%相同) および 5 塩基の置換がある *syp* subtype3 (99.4%相同) の 3 型が含まれた。290 アミノ残基からなる演繹アミノ酸配列には, 膜関連 (membrane-associated/MARVEL) ドメイン (16-260 アミノ酸配列部位) が保存されていた (Fig. 42)。サケ *Syp* subtype1 演繹アミノ酸配列は, ギンザケ *Syp*, ゼブラフィッシュ *Syp* およびヒト *SYP* と 99.0, 95.9, 68.4 および 63.6%の相同性を示した。サケ *Syp* 演繹アミノ酸配列の系統解析では, 他のサケ類 *Syp* と同じクラスターに分類された (Fig. 43)。

5-3-2. サケ幼稚魚の Snare 制御因子の遺伝子発現部位

嗅房と脳の各部位における Snare 複合体の制御因子の遺伝子発現は, *unc13-1* は嗅球と終脳で嗅房, 脳下垂体, 小脳および延髄に比べ有意に高く, 視蓋と視床+視床下部でも延髄に比べ有意に高値を示した (Fig. 44A)。*unc18-1* は視蓋と視床+視床下部で嗅房および脳下垂体に比べ有意に高く (Fig. 44B), *syp* は延髄で嗅房に比べて有意に高かった (Fig. 44C)。

5'-UTR	
Unc18-1 Chum salmon subtype1	A C G A G A G G A A T A C T G C G A G G G A G A A A G
Unc18-1 Chum salmon subtype2	
Unc18-1 Atlantic salmon	. G A G . . A T . C . G . A A G . G A G A . A G . G .
Unc18-1 Northern pike	C A G A . . A A C G A G A G . A A T A C T G C A . . .
Unc18-1 Zebrafish	
UNC18-1 Mouse	G A C . . C . . G G C G . G C G . C C C . G . G G . .
UNC18-1 Human	C G C C C . C C T G A G G A . G C G . C . G . G T C C
A G G G A G T C A A A G G G A G A G A T T G A G A A T A C G G T C A A A C A C A C A A G A G C A T C	
.	
G A . T C A A A G G G A . A G A . T . C G G T C . . A C A C A C A . T . G C A T . . T . G C A C C .	
G A . A C . G A G G . A . T C A . A G G A T T T	
.	
G C . A C . G T G T C G C G G G . G G A G C . T C G G . G C C C G A . G A C T C G A A . . A . G C .	
G C A G G . G T C G C G . G . C G A G G A G . T C G G . G C C G G G . G A C T C G C G C . . . G C .	
Sec1 domain	
M A P I G L K A V V G E K I M N D V I K K V K K K G E W	K A L I V D Q L S M R M L S S C C K M T D I
.	
.	
.	
.	
. H	. V . V
. H	. V . V
Sec1 domain	
M S D G I T I V E D I N K R R E P L P T L E A I Y L I T P T D K S V Q T L I G D F K D P H S A K Y K	
.	
. . E	
. . E	
. T E M K S	
. T E S V S E H S S P T R	
. T E S V S E H S S P T R	
Sec1 domain	
A A H V F F T D S C P D P L F N E L V K S R A S K S I K T L T E I N I A F L P Y E S Q V Y S L D N P	
.	
. V	
.	
G V T N F	
. A A . V	
. A A . V	
Sec1 domain	
D A F Q S F Y S P H K T Q L K N P V M E R L A D Q L A T L C A T L K E Y P A V R Y R G E Y	
.	
. M	
. E	
. S A . M I L E . I	
. S A . M I L E . I	

Fig. 41. Alignment of partial 5'-untranslated region (UTR) and partial deduced amino acid sequences of uncoordinated-18 isoform-1 (Unc18-1) in chum salmon, *Oncorhynchus keta* and other vertebrates. Dots correspond to residues identical to chum salmon Unc18-1 subtype 1 (登録申請中). Box indicates Sec1 domain (29-193 amino acid position). Sequence information on the UNC18-1/Unc18-1 of other vertebrates is shown in section 5-2-3.

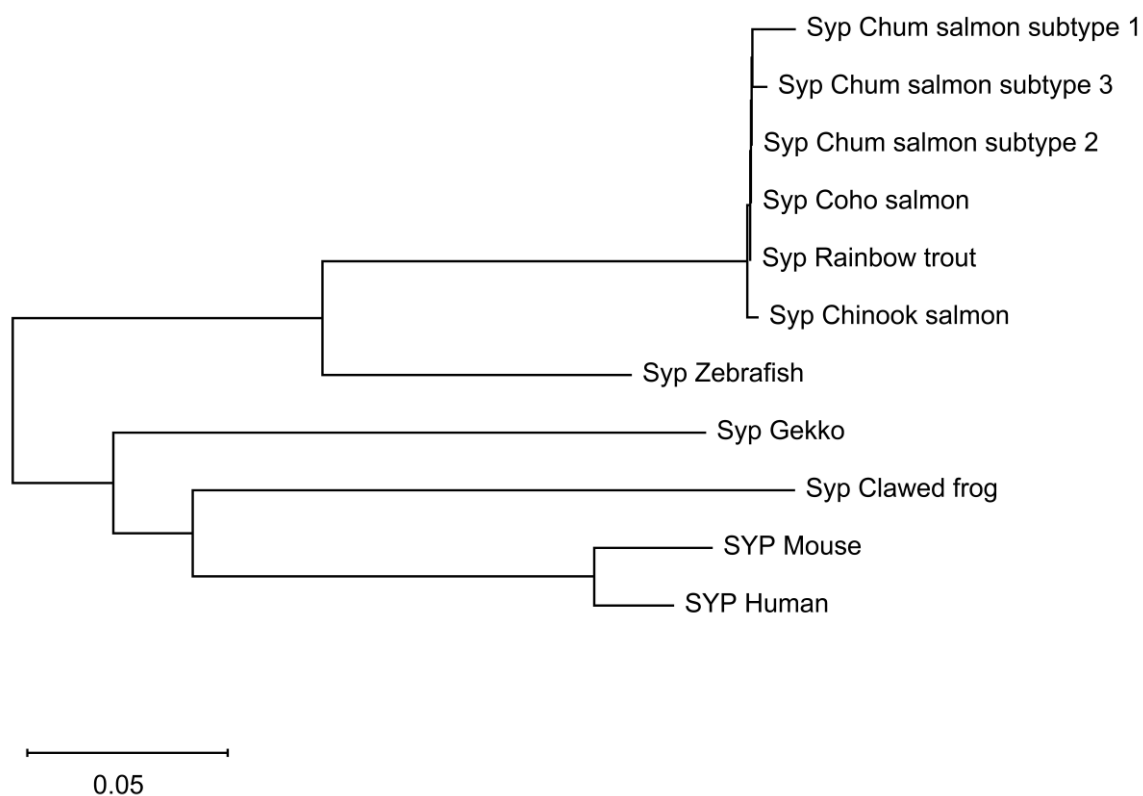


Fig. 43. Phylogenetic tree of known synaptophysins (SyPs) constructed using the neighbour-joining method. Amino acid sequences of SYP/Syp of salmon and other vertebrates. The scale bar shows residue substitutions per site in the sequence. Sequence information on the SYP/Syp of other vertebrates is shown in section 5-2-3.

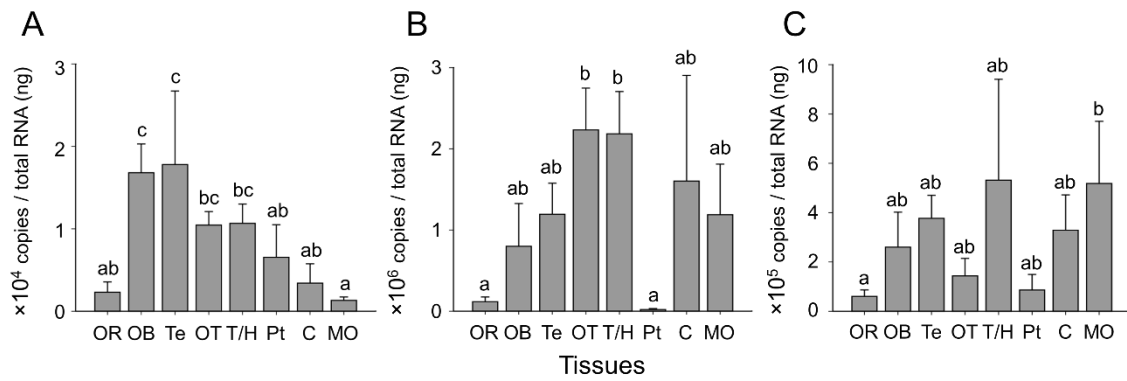


Fig. 44. Expression analyses of uncoordinated-13 isoform-1 (*unc13-1-like*: A), uncoordinated-18 isoform-1 (*unc18-1*: B), and synaptophysin (*syp*: C) in juvenile chum salmon using quantitative real-time PCR (qPCR) in brain regions: C, cerebellum, MO, medulla oblongata, OB, olfactory bulb, OR, olfactory rosette, OT, optic tectum, Pt, pituitary, Te, telencephalon, T/H, thalamus and hypothalamus. Values represent the mean $\pm$ standard error (n=5) of copies per sample RNA (ng). Shared letters indicate no significant difference ($p < 0.05$, one-way ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference test for A, and Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test for B and C).

5-3-3. サケ回遊に伴う Snare 制御因子の遺伝子発現変化

嗅房における *unc13-1* 発現は、降海中・後の幼稚魚で遡上後の成熟魚に比べ有意に高かった (Fig. 45A)。 *unc18-1* 発現は、降海前で索餌回遊中および遡上後に比べ有意に高く、遡上中盤でも遡上後に比べ高値を示した (Fig. 45B)。 *syp* 発現は、降海中・後の幼稚魚で遡上後の成熟魚に比べ有意に高かった (Fig. 45C)。嗅球の *unc13-1* 発現は、降海後で遡上中盤以外の遡上期親魚に比べて有意に高かった (Fig. 45D)。 *unc18-1* 発現は、遡上中盤で降海中と他の遡上期に比べて有意に高く、降海後でも遡上初期・後に比べて高かった (Fig. 45E)。 *syp* 発現は、降海後で索餌回遊中、遡上前・後に比べて有意に高く、遡上初期でも遡上後に比べ高値を示した (Fig. 45F)。終脳の *unc13-1* 発現は、降海後で他の回遊ステージに比べて有意に高く、降海中と遡上中盤でも遡上前・初期に比べて有意に高く、降海前でも遡上初期に比べて高値を示した (Fig. 45G)。 *unc18-1* 発現は、遡上中盤で遡上前・初期・後に比べて有意に高く、降海中・後でも遡上後に比べて高値を示した (Fig. 45H)。 *syp* 発現は、降海後で遡上前・中盤に比べ有意に高く、降海中でも遡上中盤に比べ高値を示した (Fig. 45I)。

サケ嗅房、嗅球および終脳における Snare 制御因子の遺伝子発現は、尾叉長および体重と負の相関を示した (Table 11)。嗅房の *unc13-1* 発現は、同 *unc18-1* 発現および *syp* 発現と正の相関を示した (Spearman's ρ : 0.519 および 0.829, $p < 0.01$)。同 *unc18-1* 発現は、同 *syp* 発現と正の相関を示した (ρ : 0.645, $p < 0.01$)。嗅球 *unc13-1* 発現は、同 *unc18-1* 発現および *syp* 発現と正の相関を示した (ρ : 0.844 および 0.541, $p < 0.01$)。同 *unc18-1* 発現は、同 *syp* 発現と正の相関を示した (ρ : 0.401, $p < 0.01$)。終脳 *unc13-1* 発現は、同 *unc18-1* 発現および *syp* 発現と正の相関を示した (ρ : 0.756 および 0.505, $p < 0.01$)。同 *unc18-1* 発現と *syp* 発現は相関を示さなかった (ρ : 0.080, $p = 0.613$)。

5-3-4. サケ幼稚魚脳の SNARE 制御因子の遺伝子発現細胞

サケ幼稚魚の嗅球と終脳における *unc13-1* 発現の *in situ* ハイブリダイゼーション像を Figs. 46, 47 に示す。アンチセンス鎖標識プローブを用いた反応において、*unc13-1* 発現を示す特異的シグナルが脳各部位の神経細胞核周辺部に観察された

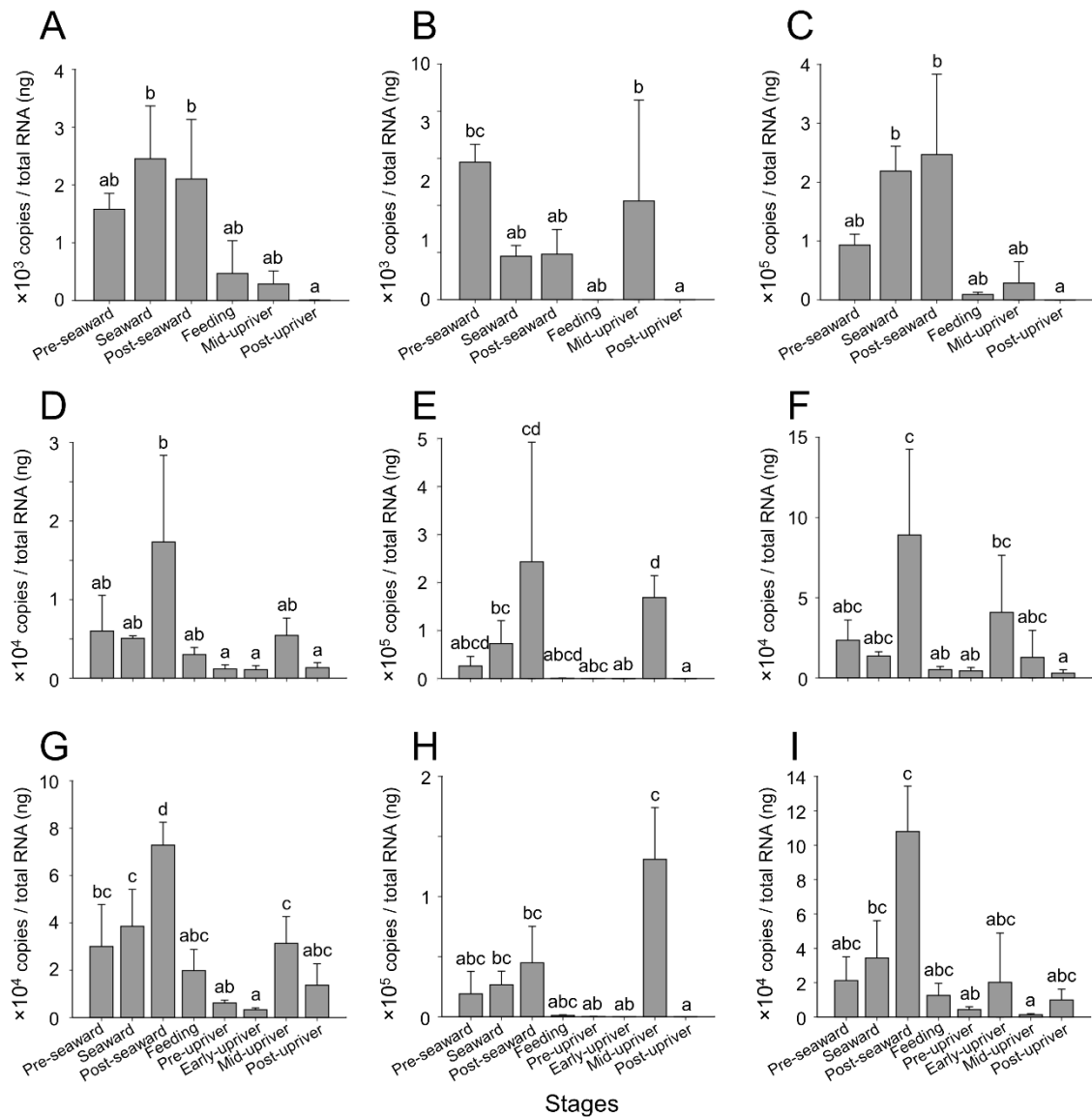


Fig. 45. Expression analyses of uncoordinated-13 isoform-1 (*unc13-1*: A, D, and G), uncoordinated-18 isoform-1 (*unc18-1*: B, E, and H), and synaptophysin (*syp*: C, F, and I) in the olfactory rosette (A-C), olfactory bulb (D-F), and telencephalon (G-I) during migration of chum salmon using quantitative real-time PCR (qPCR). Values represent the mean $\pm$ standard error ($n=5-7$) of copies per sample RNA (ng). Shared letters indicate no significant difference ($p < 0.05$, Kruskal-Wallis test followed by Dunn's multiple comparison test for A-F, H, and I and one-way ANOVA followed by Tukey's honestly significant difference test for G).

Table 11. Correlation coefficients of fork length (FL) and body weight (BW), and expression levels of *unc13-1*, *unc18-1*, and *syp* in the olfactory rosette (OR), olfactory bulb (OB), and telencephalon of hatchery origin and wild juvenile chum salmon (*Oncorhynchus keta*). Spearman's rank correlation coefficient (ρ) and p values of each data set were shown in each column from the top to the bottom. Red letters indicate significant positive correlations and blue letters indicate significant negative correlations (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

		BW g	<i>unc13-1</i> in OR	<i>unc13-1</i> in OB	<i>unc13-1</i> in Te	<i>unc18-1</i> in OR	<i>unc18-1</i> in OB	<i>unc18-1</i> in Te	<i>syp</i> in OR	<i>syp</i> in OB	<i>syp</i> in Te
FL mm	ρ	.971**	-.769**	-.662**	-.618**	-.491**	-.488**	-.473**	-.739**	-.424**	-.607**
	p value	.000	.000	.000	.000	.005	.001	.002	.000	.005	.000
BW g	ρ		-.733**	-.599**	-.573**	-.428*	-.400**	-.370*	-.703**	-.399**	-.669**
	p value		.000	.000	.000	.016	.009	.016	.000	.009	.000
<i>unc13-1</i> in OR	ρ			.539**	.551**	.519**	.475**	.357	.829**	.710**	.573**
	p value			.002	.002	.003	.008	.053	.000	.000	.001
<i>unc13-1</i> in OB	ρ				.844**	.357*	.844**	.788**	.511**	.541**	.442**
	p value				.000	.049	.000	.000	.003	.000	.003
<i>unc13-1</i> in Te	ρ					.241	.752**	.756**	.469**	.359*	.505**
	p value					.191	.000	.000	.008	.019	.001
<i>unc18-1</i> in OR	ρ						.569**	.617**	.645**	.408*	.011
	p value						.001	.000	.000	.023	.952
<i>unc18-1</i> in OB	ρ							.946**	.488**	.401**	.176
	p value							.000	.005	.009	.265
<i>unc18-1</i> in Te	ρ								.407*	.275	.080
	p value								.023	.078	.613
<i>syp</i> in OR	ρ									.627**	.503**
	p value									.000	.004
<i>syp</i> OB	ρ										.581**
	p value										.000

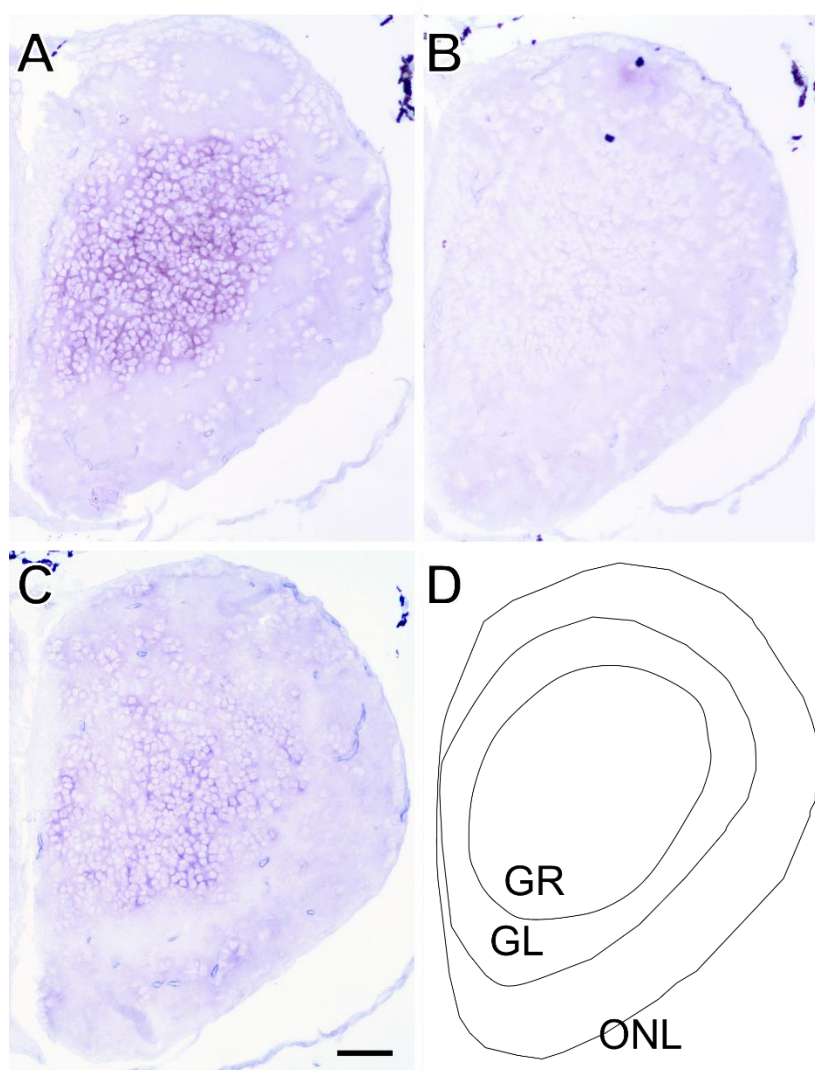


Fig. 46. Expressions of uncoordinated-13 isoform 1 (*unc13-1*) and synaptosome-associated protein isoform 25 (*snap25*) in the olfactory bulb of juvenile chum salmon. A: digoxigenin-labeled *in situ* hybridization using *unc13-1* antisense cRNA probe, B: *unc13-1* sense cRNA probe, C: antisense *snap25* cRNA probe, D: schematic diagram of frontal section of olfactory bulb, GL (glomerular layer), GR (granule cell layer), and ONL (olfactory nerve layer). Scale bar: 100 μ m.

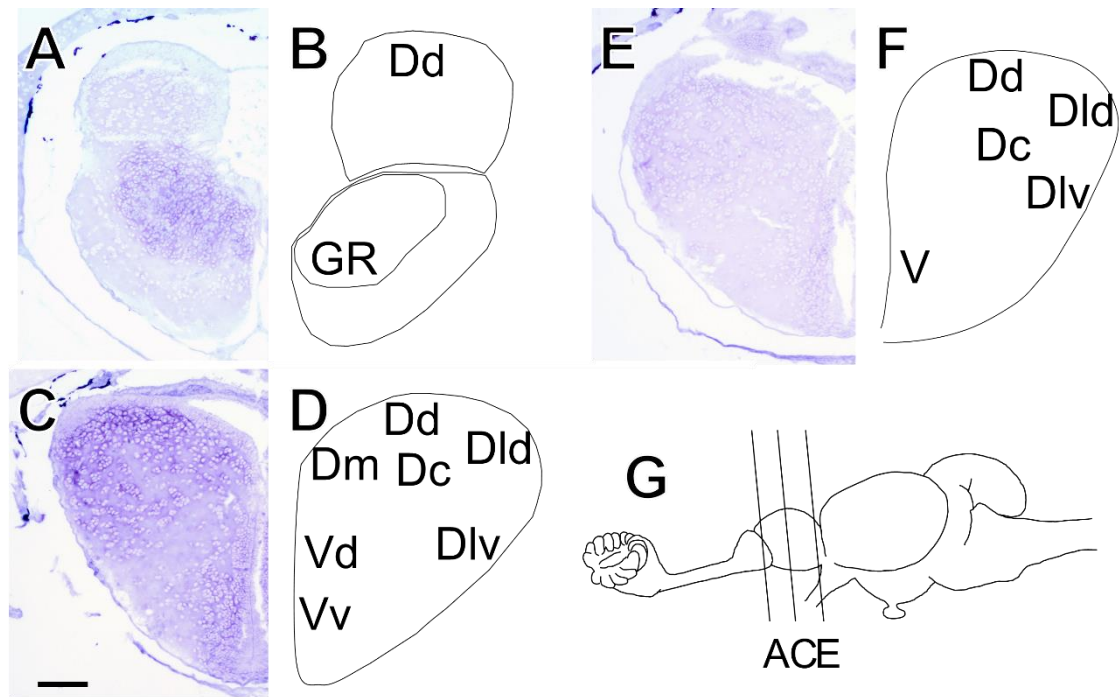


Fig. 47. Expressions of uncoordinated-13 isoform 1 (*unc13-1*) in the olfactory bulb and telencephalon of juvenile chum salmon. A, C, and E: digoxigenin-labeled *in situ* hybridization using *unc13-1* antisense cRNA probe, B, D, and F: schematic diagram of frontal sections of olfactory bulb and telencephalon. GL (glomerular layer), GR (granule cell layer), and ONL (olfactory nerve layer). G: schematic illustration of salmon brain. Scale bars: 100 μ m.

(Figs. 46A, Figs. 47A, C, E)。また、センス鎖プローブを用いた反応では特異的シグナルは認められなかった (Fig. 46B)。 *unc13-1* mRNA 発現は、嗅球顆粒細胞層 (GR), 終脳背側背側 (Dd), 同背側外側背部 (Dld), 同背側外側腹部 (Dlv), 同背側中央 (Dc), 同内側 (Dm), 同腹側背側 (Vd), 同腹側腹側 (Vv) で検出された。隣接切片を用いた反応では、 *unc13-1* および *snap25* mRNA 発現領域は嗅球顆粒細胞層で重複していた (Figs. 46A, C)。終脳における *unc13-1* 発現領域は (Figs. 47A, C, E), *snap25*, *stx1* および *vamp2* mRNA 発現領域と類似していた (Figs. 15C, E, G, 16C, E, 17C, E)。

5-4. 考察

Snare 複合体の制御因子である足場タンパク *unc13-1* と *unc18-1* およびシナプス小胞タンパク *syp* の発現および一部はその一次構造が明らかになり、脳の全部位で検出され、末梢嗅覚器官の嗅房を含む嗅神経系でも発現したことから、これらの分子はサケでも嗅覚情報の伝達にも関与することが示唆された。現在まで魚類では、 *unc13-1* の発現は確認されておらず、トランスクリプトーム解析およびゲノム情報から推定される塩基およびアミノ酸配列をもとに比較している。本研究で得られた *unc13-1* の部分配列は、ギンザケの一部のサブタイプ、カワカマスおよびゼブラフィッシュと比べて欠損部位が大きいが、一方でニジマスおよびギンザケの一部のサブタイプとは欠損領域が一致していた (Fig. 40)。このように、サケ類の中でも2型以上の *Unc13-1* サブタイプが推定されているが、サケで得られた配列がタンパクをコードするサブタイプであるかは不明であることから、今後より詳細な塩基配列の解析が必要である。*unc18* は、ゲノム情報に基づき脊椎動物で *unc18-1*, *unc18-2* および *unc18-3* の3型のアイソフォームが分化し、ゼブラフィッシュやタイセイヨウサケ等の魚類では各アイソフォームにさらに重複が生じている (Morey et al. 2017)。ゲノム編集ゼブラフィッシュでは、 *unc18-1a* の欠損では完全に遊泳能が損なわれ、脳の神経電位低下、糖代謝および高い初期死亡率を示すのに対し、 *unc18-1b* の欠損では自発的電位の減少、遊泳能と捕食者刺激反応が低下するが、代謝および生存率は正常である (Grone et al. 2016)。しかし、サケ類では、ゲノムから塩基配列が推定されているのみであり、mRNA 発現は確認されて

いない。*syp* は、ヤマトシビレエイ属の一種 (*Torpedo spp.*) で塩基配列をもとにタンパク構造が推定され (Cowan et al. 1990), 真骨魚類でもタイセイヨウダラ (*Gadus morhua*) でトランスクリプトーム解析に基づいて *syp* 様塩基配列が推定され、脳や感覚小丘での発現が報告されているが (Andersen et al. 2015), サケ科魚類において *syp* 発現を解析した例は本研究が初めてである。

unc13-1 発現は嗅球および終脳で高値を示したことから (Fig. 44A), サケ成熟魚における *snare* 遺伝子の発現分布に類似していた (Figs. 12A-D)。*unc18-1* は視蓋および視床+視床下部で、*syp* は延髄で高値を示しており、いずれも嗅球と終脳での発現が高い *snare* 遺伝子と発現分布が一致しなかった (Figs. 44B, C)。特に *syp* 発現は、シナプス小胞膜上で VAMP2 の保持に機能する分子であるにもかかわらず (Wiedenmann and Franke 1985, Jahn et al. 1985, Edelmann et al. 1995), 成熟魚の *vamp2* 発現分布とは異なった原因については不明である。*Snare* 遺伝子の発現との相違点は、制御因子 3 分子は幼稚魚、*snare* 遺伝子は成熟魚を分析に用いたことが影響した可能性がある。サケ幼稚魚脳における *Snare* 制御因子発現は、視蓋および視床+視床下部で高い *unc18-1* および小脳で高い *syp* が *snare* 遺伝子の発現傾向とは異なったが、*snare* 遺伝子同様に嗅球と終脳で認められた。このことから、サケにおける高等脊椎動物 *Snare* 制御因子のホモログは、嗅神経系でも *Snare* 複合体の制御に関わることが示唆された。*Snare* 制御因子の脳下垂体での発現は、*unc18-1* および *syp* は脳各部位に比べ低い傾向があり、*snare* 遺伝子と同様であった。一方、同 *unc13-1* 発現は小脳および延髄よりも高い傾向である点が異なった。魚類でも、高等脊椎動物同様に内分泌系でも機能する *Snare* タンパクが進化的に保存されていることから (Kloepper et al. 2008), それを制御する *Snare* 制御因子もサケ類脳下垂体に発現していると考えられる。アフリカツメガエルでは、下垂体中葉のメラニン細胞刺激ホルモン産生細胞における *unc18-1* mRNA 発現 (Kolk et al. 2001) および同中葉・下葉における *snap25* の発現が報告されており (Kolk et al. 2004), 脊椎動物では内分泌系にも *SNARE/Snare* 分子と *Snare* 制御因子が機能する。脳各部位の比較でも 3 分子の発現強度分布は一致しなかったが、本来、UNC13-1 および UNC18-1 は、アクティブゾーンで同所的に機能する分子であるため、qPCR では脳内の発現分布が異なるサブタイプを検出していた可能性がある。しかしながら、

本研究では両 *unc* の一部塩基配列を得ているのみであり厳密なサブタイプの存在や一次構造からの機能分化の推定などは出来ていないことから、分子間で各脳部位間の発現分布が異なる原因は不明であった。

嗅房における *unc13-1* および *syp* 発現は、降海期後半に高く索餌回遊期以降の成魚では低かったが、*unc18-1* 発現は降海前に高く降海中にも高く遡上中盤にも高値を示しており、制御因子 3 分子の挙動が一致していなかったが、その理由は不明であった。嗅球では、3 分子ともに降海期に発現上昇し、*unc13-1* と *unc18-1* 発現は遡上中に、*syp* 発現は遡上初期に上昇傾向を示したことから、*snare* 遺伝子の発現と共通した変動であった。終脳では、嗅球での発現変動に類似していたが降海期と遡上中の発現上昇がより明瞭だった。制御因子 3 分子発現の挙動は必ずしも一致していなかったが、UNC13-1 と UNC18-1 はシナプス前膜の足場タンパク、SYP はシナプス小胞膜のタンパクと異なるグループの分子であることから、異なる発現パターンを示した可能性がある。一方、制御因子 3 分子は遡上期間中のどこかで上方制御され、末梢側の嗅房よりも嗅覚中枢側の嗅球と終脳で明瞭であることから、嗅覚中枢の神経回路内で母川識別に機能していた可能性がある。

第6章 総合考察

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、日本産のサケ類4種の嗅覚中枢に発現する Snare 複合体構成分子 *snap25s*, *stx1s* および *vamp2* の全 CDS 配列を明らかにし (第2章), サケとカラフトマスにおいて Snare 複合体構成分子の遺伝子発現部位と回遊に伴う変化を明らかにした (第3および4章)。さらに、サケでは 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* の遺伝子発現を示した (第5章)。これらのシナプス開口放出関連分子は、降海期のサケおよびカラフトマス幼稚魚において嗅神経系での発現が高く、そのなかの一部の分子は降海中に発現の増加が認められたことから、嗅覚刷込の活性化を反映したものと考えられる。サケ科魚類の嗅覚刷込については、北米や欧州に分布するギンザケやタイセイヨウサケ等の 1⁺ 齢以降のスモルト幼魚で降海する種における研究が先行していた (Wisby and Hasler 1954, Harden Jones 1968, Ebbesson et al. 1996)。そのため、スモルト幼魚の降海期に顕著な生理学的変化である銀化変態 (PST) に着目し、内分泌系の調節による神経可塑性の一時的変化が嗅覚刷込に重要であるとの考察がなされてきた (e.g., Dittman and Quinn 1996, Ebbesson et al. 1996, Ebbesson and Braithwaite 2012)。河川生活期が短いサケでも、幼稚魚の降河中には外部環境の変化が著しい放流時や支流との合流時に、甲状腺ホルモン系の遺伝子発現上昇と NMDA 受容体サブユニット遺伝子の発現上昇が報告されている (Ueda et al. 2016)。河川生活の長さに関わらず、PST はサケ類の降海期に共通することから、嗅覚刷込と密接に関連していると考えられる。一方、近年、サケ同様にふ化・浮上した春季に 0⁺ 齢で降海するカラフトマスでも、人工香料をニオイ物質として用いた仔魚期刷込の人為的な形成が行動学的に証明されている (Bett et al. 2016)。しかしながら、ベニザケにおける仔魚期の刷込活性は PST 期に比べて低いという報告もある (Havey et al. 2017)。サケとカラフトマスでは、河川生活期の短さから仔魚期刷込と PST 期刷込が連続的に生じていると考えられる。第4章に示したように、卵黄嚢を完全には吸収しておらず稚魚になって間もない混合栄養期のサケの嗅覚中枢では、降河中の幼稚魚に比べて *snare* 遺伝子発現が低かつ

た (Figs. 32, 33)。そのため、サケにおいても、仔魚期の刷込は少なくとも降海時の PST 期よりは低い刷込活性である可能性が高い。また、サケ類はふ化後、成魚までの体成長に伴って嗅上皮のニューロン数が増加し、脳のサイズも体成長に伴って増大する。サケでは、外洋で索餌回遊する若齢魚までは成魚に比べて嗅細胞数の増加率が高い (Kudo et al. 2009)。これらのことから、仔魚期の刷込活性は、PST 期のようなホルモンサージによる制御ではなく、新生する嗅細胞および嗅球ニューロンの刺激依存的な嗅神経回路の構築によるものである可能性が考えられた。

サケとカラフトマスの間では、海洋での成長期間の長さの違いが回帰時の嗅神経系における *snare* 遺伝子の発現の違いに大きく影響した可能性が示された。沿岸に回帰した成熟途上個体は、サケでは 3⁺ 齢以上 (Salo 1991) で活発な神経発達時期を過ぎた個体だが、カラフトマスは短い海洋での成長期 (1 年弱; Heard 1991) から性成熟への切替わりから比較的短期間の個体である点が異なっている。短期間で急速に成長するカラフトマスにおける *snare* 遺伝子発現の傾向は、性成熟途上の個体でも成長期と同等の神経可塑性を保っていた可能性を示している。本研究において、回帰個体の嗅神経系で高い神経可塑性が示唆されたカラフトマスは、我が国では迷入率が高いサケ類であるとされている (e.g., 藤原 2011)。世界的に見ても、本種がサケ類で最も分布域が広いことは (Heard 1991, Quinn 2018), 迷入による母川以外の河川での再生産による分布拡大が寄与していると考えられている (e.g., Mortensen et al. 2002, Pess et al. 2014)。しかしながら、上述のように、カラフトマス稚仔魚でも刷込形成が実験的に示されていることから、刷込形成に関わる神経系は充分機能していると考えられた。沿岸域でのカラフトマス成熟途上魚の嗅神経系における高い *snare* 遺伝子の発現は、母川探索する時期の本種嗅神経系の高い神経可塑性を示唆している。そのため、カラフトマスにおける迷入行動については、母川識別能があるにもかかわらず、敢えて他河川に遡上している可能性を考慮する必要がある。本研究では、積極的な迷入行動の決定に関わる神経活動を示すデータは得られていないものの、沿岸域のカラフトマス回帰個体が終脳における高い神経可塑性から、ニオイ情報を想起して母川識別に関わる高度な情報処理・判断を行っている可能性が考えられた。

サケとカラフトマスにおける *snare* 遺伝子の回遊に伴う発現変化から、嗅神経系の発達、母川刷込および記憶想起の 3 つの要素との関連が示唆されたが、具体的に各回遊ステージでの発現がどれを強く反映しているか明確にはできなかった。これには、mRNA 発現量と機能的なタンパクの存在量の変動に存在するギャップ、シナプス前膜アクティブゾーンにおける Snare 複合体構成タンパクのリサイクルおよび Snare 複合体の制御因子の存在が関連していると考えられた。ラット小脳顆粒細胞では、*in vitro* でニューロンの成熟に伴って SNAP25 および STX1a のタンパクの半減期が伸長する (Sanders et al. 1998)。同様に、*in vitro* でラット胚の海馬ニューロンの成熟に伴って VAMP2 の安定性が増す (Daly and Ziff 1997)。このようなタンパクレベルの知見から、サケ類でも成魚での低い *snare* 遺伝子発現は、単にシナプス可塑性が低い状態を示すのでは無く、すでに存在しているタンパクが機能していることを反映しているとも可能性もある。本研究では、*snare* および Snare 制御因子の遺伝子発現は、遡上期にも一時的に上昇したことから母川識別との関連が示唆された。また、細胞内局在が同所的であると考えられる分子間 (アクティブゾーン: *snap25* と *stx1*, *unc13-1* と *unc18-1*, シナプス小胞膜: *vamp2* と *syp*) でも発現上昇するステージが異なる点があったことから、サケ類嗅神経に発現する各分子のサブタイプ間で発現変動が異なる可能性や、分子間でタンパクのターンオーバーが異なる可能性が考えられた。

降河中のサケ幼稚魚に着目した解析では、北海道南西部地方で有数のサケ増殖河川である遊楽部川中・下流域において、放流からの日数の異なる個体間で *snare* 遺伝子の発現を比較した。そのなかでも、*stx1s* および *vamp2* は放流後日数の短い個体で発現が高く、体サイズから放流後に成長停滞したと思われる個体では発現が低い傾向があった。嗅神経系における *snare* 遺伝子の発現、体サイズおよび放流後の日数から、放流直後で成長率が高い個体の嗅覚刷込活性が特に高い可能性が示された。サケとは異なり 1+ 齢以降のスモルト幼魚で降海する種ではあるが、ギンザケは降海期でもある PST 期に一時的に神経伝達物質の脳内濃度が上昇する (Ebbesson et al. 1996)。また、ギンザケ PST 期にホルモンサージによって “Imprinting window” と呼ばれる限られた時期に神経可塑性が高まることが示唆されている (Dittman and Quinn 1996)。サケはごく短期間に降海することから、PST に伴う神経

可塑性の上昇も短期間であると考えられる。放流後 2-3 日で下流域まで降河した個体の嗅球における *snare* 遺伝子の発現は、早期稚魚を含む降河前稚魚より高く、降河にそれより長い日数を要した個体または下流域に滞留していた個体と比べても高かった。この結果は、降河の過程で限られた時期に神経可塑性が上昇すること、もしくは高い神経可塑性を示す個体は高成長で速やかに降河したことの 2 つの可能性を示している。

サケ嗅神経系における *Snare* 制御因子の遺伝子発現は、*snare* 遺伝子のものと同調し、ほぼ同一の脳領域に発現したことから、高等脊椎動物と同様に *Snare* タンパクの保持と *Snare* 複合体形成 (Jahn et al. 1985, Wiedenmann and Franke 1985, Edelmann et al. 1995, Dulubova et al. 1999, Richmond et al. 2001, Kaeser et al. 2011) に機能していると考えられた。より詳細な分子間相互作用を明らかにするためには、mRNA 発現とタンパク発現の時間的ギャップおよびタンパク存在量とのギャップについても考慮する必要があると考えられる。そのため、今後は、サケ類においてもタンパクレベルの *Snare* 関連分子の解析が不可欠になってくるものと考えられた。

幼稚魚期の生育環境の違いによる中枢神経系発達への影響については、異なる生育環境を経験してきた野生魚とふ化場魚で両 *snap25s* アイソフォームの発現量が異なった。一方、降河中のサケ幼稚魚では、*stx1s* および *vamp2* の方がステージ間の発現量の差が明瞭であった。各 *snare* 遺伝子は、嗅神経系のシナプス可塑性を反映していると考えられるが、生育環境の違いが *snap25s* に影響し、成長と刷込の過程である降河ステージの違いが *stx1s* と *vamp2* に影響した経路については不明である。神経解剖学的研究では、ニジマス仔魚の小脳の体積は、自然河川 > 複雑な飼育環境 > 単純な飼育環境の順に大きく (Kihlslinger and Nevitt 2006)、体サイズが同じニジマス野生魚とふ化場魚では、野生魚の小脳、嗅球および終脳の体積がふ化場魚に比べて大きい (Marchettia and Nevitt 2003)。このことから、生育環境はサケ類の神経系発達にも影響すると考えられる。タイセイヨウサケ幼魚の野生魚とふ化場魚でも、行動学的および神経生理学的に異なる特性を示すことから、現在のふ化場施設の環境が仔稚魚の成長に負の影響を与える可能性が指摘されている (Mes et al. 2018)。そのため、ふ化場施設の環境の画一性を低減して環境刺激

を与えるという「環境エンリッチメント」の有用性が議論されている (Rabin 2003, Kihlslinger and Nevitt 2006)。実際にサケ科魚類の飼育環境のエンリッチメントによって、終脳における神経細胞の増加や神経可塑性の上昇が報告されている (Lema et al. 2005, Gro et al. 2013)。しかしながら、本研究では、脳内のシナプス結合の存在量や中枢神経系の機能を反映する *snare* 遺伝子の発現量は、野生魚とふ化場魚間では限られた分子しか発現差を示さなかった。刺激の多い環境が中枢神経系の発達を促進することはタイセイヨウサケにおいて最初期遺伝子と神経栄養因子の mRNA 発現解析からも示唆されているが (Mes et al. 2018)、体サイズ等の考慮すべき要因は多いため、野生魚とふ化場魚で脳の高次機能に差があるかについてはさらなる研究と議論を要すると考えられる。

以上のように、サケ類の嗅神経系においてシナプス開口放出関連分子として *Snare* 複合体構成分子とその制御因子の遺伝子発現変化から、嗅覚刷込を行う幼稚魚期に嗅神経系の発達およびその発達期の中で一時的な神経可塑性の上昇との関連が示唆された。一方、母川回帰・遡上する親魚では、外部環境の変化と性成熟に関わる内分泌系の変化といった体内外の環境変化がトリガーとなって神経可塑性が上昇し、記憶を想起している可能性が示された (Fig. 48)。

我が国におけるサケふ化放流事業では、上流域にあるふ化・育成施設から近隣の放流河川の下流域に活魚移送して放流、あるいは海面に設置した生簀による海中育成後の海中放流といった河川流路を省略した放流も行われている (宮腰ら 2016)。このような放流方法は、1960～90 年代のサケ漁獲量が好調に推移していたことから (Miyakoshi et al. 2013)、沿岸域に設置された定置網での漁獲を目的とした増殖事業という観点からは十分に目的を達成していたものと考えられる。一方、ふ化場魚を含む回帰親魚は、全てが定置網や河川の捕獲施設で漁獲されるわけではなく、一部は河川に遡上し自然産卵 (再生産) をする (森田ら 2013, 上田ら 2017)。また、自然再生産魚は、海由来の栄養塩の陸域の輸送や遡上河川の環境に適応した系群の維持など生物多様性に貢献している (Koshino et al. 2013)。そのため、ふ化場魚であっても正確な母川回帰能力を維持させることは重要である。河川流路を省略した放流方法では、降河行動に伴って刻々と変化する河川水のニオイ組成や水流等の各種環境情報の逐次刷込 (Harden Jones 1968, Bett and Hinch

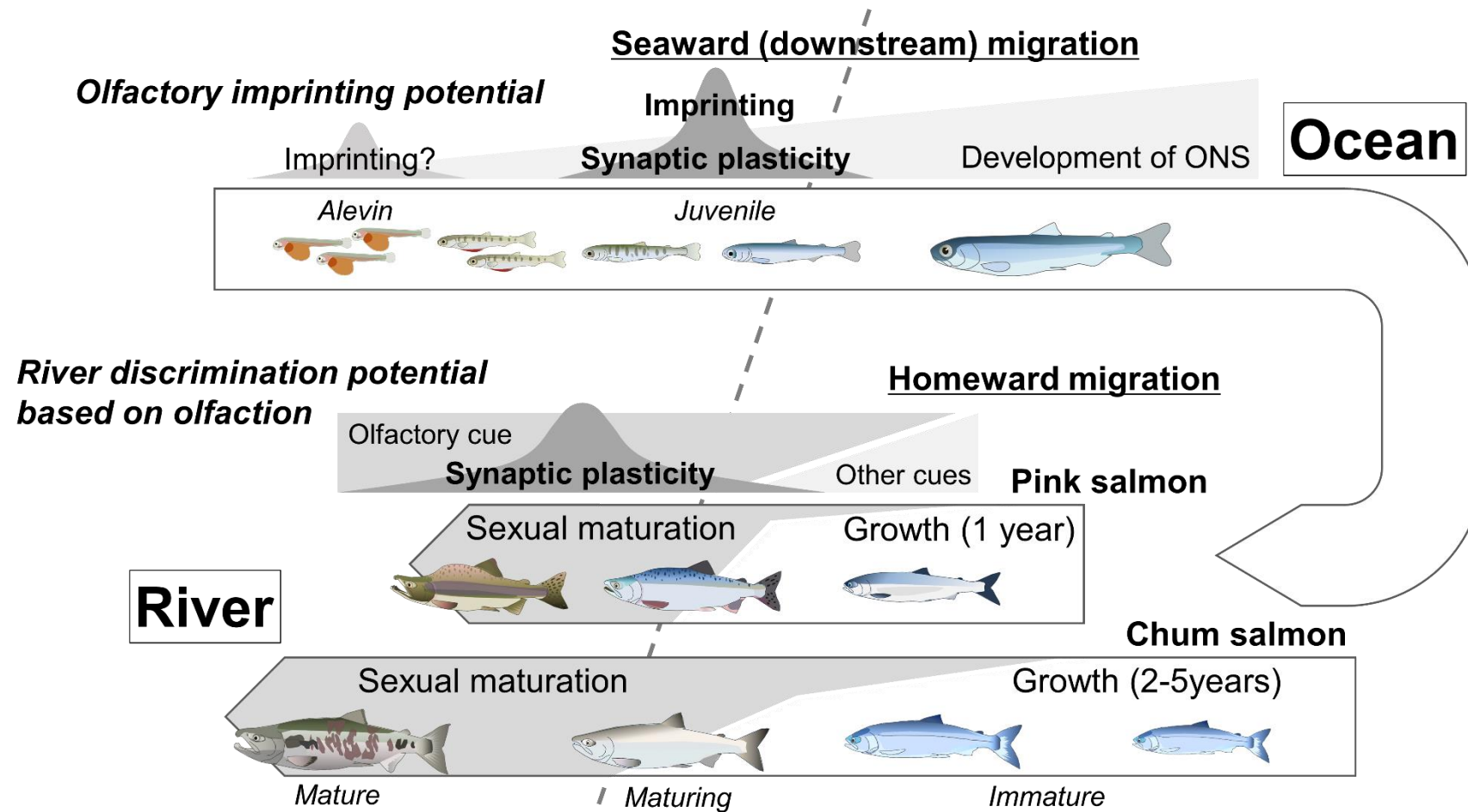


Fig. 48. Schematic illustration indicates synaptic plasticity in the olfactory nervous system and related physiological changes and environmental cues in both seaward and homeward migration of chum salmon (*Oncorhynchus keta*) and pink salmon (*O. gorbuscha*). ONS: olfactory nervous system.

2016) ができない。本研究においても降河中のサケ幼稚魚嗅神経系では、放流直後の限られた期間における高い神経可塑性状態を示唆しており、その過程を省略し下流域や海中に移送して放流した場合には、母川情報を刷込できない可能性が高い。また、放流後 2-3 日および 9-10 日後の降河中サケ幼稚魚での *snare* 遺伝子発現上昇は、ふ化場から河川への放流が刺激となっていることも考えられる。これらのことから、降海時の嗅神経系の神経可塑性の一時的な上昇を利用するために、河川流路を省略した放流ではなく、実際に河川を降河させることが重要であると考えられる。しかしながら、放流後の鳥類を含む天敵からの食害を考慮すると、河川流路を省略した放流の必要性もあり、その場合においても育成期間中に放流河川固有のニオイ成分等を人為的に経験させる等といった放流技術のさらなる高度化が必要であると考えられた。

以上、本研究では、日本に分布する遡河性サケ属魚類のうち主要な水産対象種であるサケを始めとする 4 種の嗅神経系において、初めてシナプス開口放出関連分子の一次構造およびその遺伝子発現を明らかにし、サケとカラフトマスの降海、索餌および遡上期といった主な回遊ステージにおける発現状況を解明した。サケ類の *snare* およびその制御因子の遺伝子発現変動は、神経系の発達との関連を強く示すと同時に、嗅覚刷込および母川識別に関わる神経可塑性の上昇への関与を示唆した。これらのシナプス開口放出関連遺伝子の発現を解析することにより、サケ類幼稚魚のシナプス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展開でき、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た。

謝 辞

本研究を行うにあたり、終始懇切な御指導と本論文の御校閲の労を賜った北海道大学大学院水産科学研究院海洋生物資源科学部門海洋共生学分野の安井 肇特任教授、工藤秀明教授および BOWER John Richard 准教授、同応用生命科学部門増殖生物学分野の東藤 孝准教授に対して心よりお礼申し上げます。また、共通機器の DNA シーケンサーの維持管理をしていただいた同分野の平松尚志准教授にも感謝の意を表す。供試魚の採集に便宜を図っていただいた同大学水産学部附属練習船おしよる丸 V 世高木省吾船長はじめ士官および乗組員の方々、同大学北方生物圏フィールド科学センター洞爺臨湖実験所の傳法 隆助教および職員の方々、北海道立総合研究機構さけます・内水面試験場、北海道さけ・ます増殖事業協会および渡島管内さけ・ます増殖事業協会、北見管内さけ・ます増殖事業協会、八雲漁業協同組合の方々に感謝の意を表す。本研究に対する数々のご指摘を頂いた、旧海洋生物資源保全管理学講座 OB であるさけます・内水面水産試験場さけます資源部の越野陽介博士、標津サーモン科学館館長の市村正樹博士、国立研究開発法人水産研究・教育機構水産資源研究所さけます部門の箕輪ゆい氏をはじめとする海洋共生学講座卒業・修了生の皆様、海洋共生学講座博士前期課程 2 年の中野陽太氏、若林佑樹氏、同 1 年の小西純之介氏、鳥巢泰正氏、学部 4 年の浅見優斗氏、岡田光平氏、荻原淳司氏に心より感謝の意を表す。

引用文献

- Almers, W., and Chen, W. (2005) Two ribeye genes in teleosts: The role of ribeye in ribbon formation and bipolar cell development. *Journal of Neuroscience*, **25**: 941–949.
- Andersen, Ø., Johnsen, H., De Rosa, M. C., Præbel, K., Stjelja, S., Kirubakaran, T. G., Pirolli, D., Jentoft, S., and Fevolden, S. E. (2015) Evolutionary history and adaptive significance of the polymorphic Pan I in migratory and stationary populations of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Marine Genomics*, **22**: 45–54.
- Arancillo, M., Min, S., Gerber, S., Mu, A., Wu, Y., Herman, M., Thorsten, T., Jong-Cheol, R., Gudrun, A. H., Dietmar, R., and Su, T. C. (2013) Titration of syntaxin1 in mammalian synapses reveals multiple roles in vesicle docking, priming, and release probability. *The Journal of Neuroscience*, **33**: 16698–16714.
- Bandoh, H., Kida, I., and Ueda, H. (2011) Olfactory responses to natal stream water in sockeye salmon by BOLD fMRI. *PLoS ONE*, **6**: e16051.
- Bark, I. C. (1993) Structure of the chicken gene for SNAP25 reveals duplicated exons encoding distinct isoforms of the protein. *Journal of Molecular Biology*, **233**: 67–76.
- Bark, I. C., and Wilson, M. C. (1994) Human cDNA clones encoding two different isoforms of the nerve terminal protein SNAP-25. *Gene*, **139**: 291–292.
- Bark, I. C., Hahn, K. M., Ryabinin, A. E., Wilson, M. C., Bark, C., Ryabinin, A. E., and Wilson, M. C. (1995) Differential expression of SNAP-25 protein isoforms during divergent vesicle fusion events of neural development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Neurobiology*, **92**: 1510–1514.
- Becerra, M., Jesus, M., Rodoligues-Moldes, I., and Andón, R. (1994) Primary olfactory fibers project to the ventral telencephalon and preoptic region in trout (*Salmo trutta*): A developmental immunocytochemical study. *The Journal of Comparative Neurology*, **342**: 131–143.
- Bennett, M., Calakos, N., and Scheller, R. (1992) Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones. *Science*, **257**: 255–259.
- Berthelot, C., Brunet, F., Chalopin, D., Juanchich, A., Bernard, M., Noël, B., Bento, P., Silva, C. D., Labadie, K., Alberti, A., Aury, J. M., Louis, A., Dehais, P., Bardou, P., Montfort, J., Klopp, C., Cabau, C., Gaspin, C., Thorgaard, G. H., Boussaha, M., Quillet, E., Guyomard, R., Galiana, D., Bobe, J., Volff, J. N., Genêt, C., Wincker, P., Jaillon, O., Crollius, H. R., and Guiguen, Y. (2014) The rainbow trout genome provides novel insights into evolution after whole-genome duplication in vertebrates. *Nature Communications*, **5**: 3657.
- Bett, N. N., and Hinch, S. G. (2016) Olfactory navigation during spawning migrations: a review and introduction of the hierarchical navigation hypothesis. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, **91**: 728–759.
- Bett, N. N., Hinch, S. G., Dittman, A. H., and Yun, S. S. (2016) Evidence of olfactory imprinting at an early life stage in pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). *Scientific Reports*, **6**: 36393.

- Biehlmaier, O., Neuhauss, S. C. F., and Kohler, K. (2003) Synaptic plasticity and functionality at the cone terminal of the developing zebrafish retina. *Journal of Neurobiology*, **56**: 222–236.
- Brunker, A. T., Choi, U. B., Lai, Y., Leitz, J., White, K. I., and Zhou, Q. (2019) The pre-synaptic fusion machinery. *Current Opinion in Structural Biology*, **54**: 179–188.
- Boschert, U., O’Shaughnessy, C., Dickinson, R., Tessari, M., Bendotti, C., and Catsicas, S. (1996) Developmental and plasticity-related differential expression of two SNAP-25 isoforms in the rat brain. *The Journal of Comparative Neurology*, **367**: 177–193.
- Brose, N., Hofmann, K., Hata, Y., and Südhof, T. C. (1995) Mammalian homologues of *Caenorhabditis elegans* unc-13 gene define novel family of C2-domain proteins. *Journal of Biological Chemistry*, **270**: 25273–25280.
- Bustin, S. T., Benes, V., Garson, J. A., Hallemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., and Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, **55**: 611–622.
- Burkhardt, P., Hattendorf, D. A., Weis, W. I., and Fasshauer, D. (2008) Munc18a controls SNARE assembly through its interaction with the syntaxin N-peptide. *EMBO Journal*, **27**: 923–933.
- Catsicas, S., Larhammar, D. A. N., Blomqvist, A., Sanna, P. P., Milner, R. J., and Wilson, M. C. (1991) Expression of a conserved cell-type-specific protein in nerve terminals coincides with synaptogenesis: *Proceedings of the National Academy of Sciences.*, **88**: 785–789.
- Chai, Y., Huang, X., Cong, B., Liu, S., Chen, K., Li, G., and Gaisano, H. Y. (2006) Involvement of VAMP-2 in exocytosis of IL-1 β in turbot (*Scophthalmus maximus*) leukocytes after *Vibrio anguillarum* infection. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **342**: 509–513.
- Chen, K., and Huang, X. (2007) Structural analysis of SNARE motifs from sea perch, *Lateolabrax japonicus* by computerized approaches. *Computational Biology and Chemistry*. **31**: 378-383.
- Corona, R., Meurisse, M., Cornilleau, F., Moussu, C., Keller, M., and Lévy, F. (2018) Disruption of adult olfactory neurogenesis induces deficits in maternal behavior in sheep. *Behavioural Brain Research*, **347**: 124–131.
- Cowan, D., Linial, M., and Scheller, R. H. (1990) Torpedo synaptophysin: evolution of a synaptic vesicle protein. *Brain Research*, **509**: 1–7.
- Daly, C., and Ziff, E. B. (1997) Post-transcriptional regulation of synaptic vesicle protein expression and the developmental control of synaptic vesicle formation. *The Journal of Neuroscience*, **17**: 2365–2375.
- Davis, S., Rodger, J., Hicks, A., Mallet, J., and Laroche, S. (1996) Brain structure and task-specific increase in expression of the gene encoding syntaxin 1B during learning in the rat : A potential molecular marker for learning-induced synaptic plasticity in neural networks. *European Journal of Neuroscience*, **8**: 2068–2074.
- Deák, F., Schoch, S., Liu, X., Südhof, T. C., and Kavalali, E. T. (2004) Synaptobrevin is essential for fast synaptic-vesicle endocytosis. *Nature Cell Biology*, **6**: 1102–1108.
- Delgado-Martinez, I., Nehring, R. B., and Sorensen, J. B. (2007) Differential abilities of

- SNAP-25 homologs to support neuronal function. *Journal of Neuroscience*, **27**: 9380–9391.
- Dittman, A., and Quinn, T. (1996). Homing in Pacific salmon: mechanisms and ecological basis. *The Journal of Experimental Biology*, **199**: 83–91.
- Dittman, A. H., Quinn, T. P., and Nevitt, G. A. (1996) Timing of imprinting to natural and artificial odors by coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **53**: 434–442.
- Dittman, J. S. (2019) Unc13: a multifunctional synaptic marvel. *Current Opinion in Neurobiology*, **57**: 17–25.
- Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Südhof, T. C., and Rizo, J. (1999) A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *The EMBO Journal*, **18**: 4372–4382.
- Ebbesson, L. O. E., and Braithwaite, V. A. (2012) Environmental effects on fish neural plasticity and cognition. *Journal of Fish Biology*, **81**: 2151–2174.
- Ebbesson, L. O. E., Holmqvist, B., Ostholm, T., and Ekström, P. (1992) Transient serotonin-immunoreactive neurons coincide with a critical period of neural development in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Cell and Tissue Research*, **268**: 389–392.
- Ebbesson, S. O. E., Smith, J., Co, C., and Ebbesson, L. O. E. (1996) Transient alterations in neurotransmitter levels during a critical period of neural development in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *Brain Research*, **742**: 339–342.
- Edelmann, L., Hanson, P. I., Chapman, E. R., and Jahn, R. (1995) Synaptobrevin binding to synaptophysin: A potential mechanism for controlling the exocytotic fusion machine. *EMBO Journal*, **14**: 224–231.
- Elferink, L. A., Trimble, W. S., and Scheller, R. H. (1989) Two vesicle-associated membrane protein genes are differentially expressed in the rat central nervous system. *The Journal of Biological Chemistry*, **264**: 11061–11064.
- Eriksson, P. S., Perfilieva, E., Bjork-Eriksson, T., Alborn, A. M., Nordborg, C., Peterson, D. A., and Gage, F. H. (1998) Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nature Medicine*, **4**: 1313–1317.
- 藤原 真 (2011) カラフトマスの放流効果は？. 北水誌だより, **82**
- Fujiwara, T., Mishima, T., Kofuji, T., Chiba, T., Tanaka, K., and Yamamoto, A. (2006) Analysis of knock-out mice to determine the role of HPC-1 / syntaxin 1A in expressing synaptic plasticity. *The Journal of Neuroscience*, **26**: 5767–5776.
- Folgueira, M., Anadón, R., and Yáñez, J. (2004a) An experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). I: Olfactory bulb and ventral area. *Journal of Comparative Neurology*, **480**: 180–203.
- Folgueira, M., Anadón, R., and Yáñez, J. (2004b) Experimental study of the connections of the telencephalon in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). II: Dorsal area and preoptic region. *Journal of Comparative Neurology*, **480**: 204–233.
- Grandel, H., and Brand, M. (2013) Comparative aspects of adult neural stem cell activity in vertebrates. *Development Genes and Evolution*, **223**: 131–147.
- Gro, A., Salvanes, V., Moberg, O., Ebbesson, L. O. E., Nilsen, T. O., Jensen, K. H., and Braithwaite, V. A. (2013) Environmental enrichment promotes neural plasticity and

- cognitive ability in fish. *Proceedings of the Royal Society B*, **280**: 20131331.
- Grone, B. P., Marchese, M., Hamling, K. R., Kumar, M. G., Krasniak, C. S., Sicca, F., Santorelli, F. M., Patel, M., and Baraban, S. C. (2016) Epilepsy, behavioral abnormalities, and physiological comorbidities in syntaxin-binding protein 1 (STXBP1) mutant zebrafish. *PLoS ONE*, **11**: e0151148. 1–25.
- Hansen, A., and Zielinski, B. S. (2005) Diversity in the olfactory epithelium of bony fishes: development, lamellar arrangement, sensory neuron cell types and transduction components. *Journal of Neurocytology*, **34**: 183–208.
- Hara, T. J., and Zhang, C. (1996) Spatial projections to the olfactory bulb of functionally distinct and randomly distributed primary neurons in salmonid fishes. *Neuroscience Research*, **26**: 65–74.
- Harden Jones, F. R. (1968) Salmon and Trout. In: Harden Jones, F. R (Ed.), *Fish Migration* (pp. 42–68). New York: St Martin's Press.
- Hasegawa, K., Morita, K., Ohkuma, K., Ohnuki, T., and Okamoto, Y. (2014) Effects of hatchery chum salmon fry on density-dependent intra- and interspecific competition between wild chum and masu salmon fry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **71**: 1475–1482.
- Hata, Y., Slaughter, C. A., and Südhof, T. C. (1993) Synaptic vesicle fusion complex contains unc-18 homologue bound to syntaxin. *Nature*, **336**: 347–351.
- Havey, M. A., Dittman, A. H., Quinn, T. P., Lema, S. C., and May, D. (2017) Experimental evidence for olfactory imprinting by sockeye salmon at embryonic and smolt stages. *Transactions of the American Fisheries Society*, **146**: 74–83.
- Heard, W. R. (1991) Life history of pink salmon (*Oncorhynchus gorbuscha*). In: C. Groot, and L. Margolis (Eds.), *Pacific Salmon Life Histories* (pp. 120–230). Vancouver, British Columbia, Canada: UBC Press.
- Herde, M. K., Iremonger, K. J., Constantin, S., and Herbison, A. E. (2013) GnRH neurons elaborate a long-range projection with shared axonal and dendritic functions. *Journal of Neuroscience*, **33**: 12689–12697.
- 北海道水産林務部 (2010) 平成 22 年北海道水産現勢, 2012 年 3 月 2 日最終更新.
- 北海道水産林務部 (2011) 平成 23 年北海道水産現勢, 2013 年 8 月 16 日最終更新.
- 北海道水産林務部 (2012) 平成 24 年北海道水産現勢, 2013 年 12 月 26 日公表.
- 北海道水産林務部 (2013) 平成 25 年北海道水産現勢, 2014 年 12 月 17 日公表.
- 北海道水産林務部 (2014) 平成 26 年北海道水産現勢, 2016 年 7 月 12 日最終更新.
- 北海道水産林務部 (2015) 平成 27 年北海道水産現勢, 2016 年 12 月 15 日公表.
- 北海道水産林務部 (2016) 平成 28 年北海道水産現勢, 2017 年 12 月 15 日公表.
- 北海道水産林務部 (2017) 平成 29 年北海道水産現勢, 2018 年 12 月 20 日公表.
- 北海道水産林務部 (2018) 平成 30 年北海道水産現勢, 2020 年 1 月 17 日最終更新.
- 北海道水産林務部 (2019) 令和元年北海道水産現勢, 2020 年 12 月 15 日公表.
- Hiesinger, P. R., Reiter, C., Schau, H., and Fischbach, K. F. (1999) Neuropil pattern formation and regulation of cell adhesion molecules in *Drosophila* optic lobe development depend on synaptobrevin. *The Journal of Neuroscience*, **19**: 7548–7556.
- Horikawa, H. P., Saisu, H., Ishizuka, T., Sekine, Y., Tsugita, A., Odanib, S., and Abe, T. (1993) A complex of rab3A, SNAP-25, VAMP/synaptobrevin-2 brain presynaptic terminals and syntaxins in. *FEBS Letters*, **330**: 236–240.

- Inoue, A., Obata, K., and Akagawa, K. (1992) Cloning and sequence analysis of cDNA for a neuronal cell membrane antigen, HPC-1. *Journal of Biological Chemistry*, **267**: 10613–10619.
- Jacobsson, G., and Meister, B. (1996) Molecular components of the exocytotic the rat pituitary gland. *Endocrinology*, **137**: 5344–5356.
- Jahn, R., Schiebler, W., Ouimet, C., and Greengard, P. (1985) A 38,000-dalton membrane protein (p38) present in synaptic vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **82**: 4137–4141.
- Johansson, J. U., Ericsson, J., Janson, J., Beraki, S., Stanić, D., Mandic, S. A., Wikström, M. A., Hökfelt, T., Ögren, S. O., Rozell, B., Berggren, P. O., and Bark, C. (2008) An ancient duplication of exon 5 in the snap25 gene is required for complex neuronal development/function. *PLoS Genetics*. **4**: e100278.
- Johnstone, K. A., Lubieniecki, K. P., Koop, B. F., and Davidson, W. S. (2011) Expression of olfactory receptors in different life stages and life histories of wild Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Molecular Ecology*, **20**: 4059–4069.
- Kaesler, P. S., Deng, L., Wang, Y., Dulubova, I., Liu, X., Rizo, J., and Südhof, T. C. (2011) RIM proteins tether Ca²⁺ channels to presynaptic active zones via a direct PDZ-domain interaction. *Cell*, **144**: 282–295.
- Kaneko, N., Torao, M., Koshino, Y., Fujiwara, M., Miyakoshi, Y., and Shimizu, M. (2019) Evaluation of growth status using endocrine growth indices, insulin-like growth factor (IGF)-I and IGF-binding protein-1b, in out-migrating juvenile chum salmon. *General and Comparative Endocrinology*, **274**: 50–59.
- Kawakami, S., Ohmoto, M., Itoh, S., Yuasa, R., Inagaki, H., Nishimura, E., Ito, T., and Misaka, T. (2012) Accumulation of SNAP25 in mouse gustatory and somatosensory cortices in response to food and chemical stimulation. *Neuroscience*, **218**: 326–334.
- Kihlslinger, R. L., and Nevitt, G. A. (2006) Early rearing environment impacts cerebellar growth in juvenile salmon. *Journal of Experimental Biology*, **209**: 504–509.
- Kim, J. H., Leong, J. S., Koop, B. F., and Devlin, R. H. (2016) Multi-tissue transcriptome profiles for coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*), a species undergoing rediploidization following whole-genome duplication. *Marine Genomics*, **25**: 33–37.
- Kitahashi, T., Ando, H., Urano, A., Ban, M., Saito, S., Tanaka, H., Naito, Y., and Ueda, H. (2000) Micro data logger analyses of homing behavior of chum salmon in Ishikari bay. *Zoological Science*, **17**: 1247–1253.
- Kloepper, T. H., Kienle, C. N., and Fasshauer, D. (2008) SNAREing the basis of multicellularity: Consequences of protein family expansion during evolution. *Molecular Biology and Evolution*, **25**: 2055–2068.
- Kofuji, T., T. F., Sanada, M., Mishima, T., and Akagawa, K. (2014) HPC-1/syntaxin 1A and syntaxin 1B play distinct roles in neuronal survival. *Journal of Neurochemistry*, **130**: 514–525.
- Kolk, S. M., Berghs, C. A. F. M., Vaudry, H., Verhage, M., and Roubos, E. W. (2001) Physiological control of xunc18 expression in neuroendocrine melanotrope cells of *Xenopus laevis*. *Endocrinology*, **142**: 1950–1957.
- Kolk, S. M., Groffen, A. J. A., Tuinhof, R., Ouwens, D. T. W. M., Cools, A. R., Jenks, B. G., Verhade, M., and Roubos, E. W. (2004) Differential distribution and regulation of

- expression of synaptosomal-associated protein of 25 kDa isoforms in the *Xenopus* pituitary gland and brain. *Neuroscience*, **128**: 531–543.
- Koshino, Y., Kudo, H., and Kaeriyama, M. (2013) Stable isotope evidence indicates the incorporation into Japanese catchments of marine-derived nutrients transported by spawning Pacific salmon. *Freshwater Biology*, **58**: 1864–1877.
- Kudo, H., Hyodo, S., Ueda, H., Hiroi, O., Aida, K., Urano, A., and Yamauchi, K. (1996a) Cytophysiology of gonadotropin-releasing-hormone neurons in chum salmon (*Oncorhynchus keta*) forebrain before and after upstream migration. *Cell and Tissue Research*, **284**: 261–267.
- Kudo, H., Ueda, H., and Yamauchi, K. (1996b) Immunocytochemical investigation of a salmonid olfactory system-specific protein in the Kokanee salmon (*Oncorhynchus nerka*). *Zoological Science*, **13**: 647–653.
- Kudo, H., Shinto, M., Sakurai, Y., and Kaeriyama, M. (2009) Morphometry of olfactory lamellae and olfactory receptor neurons during the life history of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Chemical Senses*, **34**: 617–624.
- Lambert, T. J., Fernandez, S. M., and Frick, K. M. (2005) Different types of environmental enrichment have discrepant effects on spatial memory and synaptophysin levels in female mice. *Neurobiology of Learning and Memory*, **83**: 206–216.
- Lee, C., Kim, J., Shin, S. G., and Hwang, S. (2006) Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, **123**: 273–280.
- Lema, S. C., Hodges, M. J., Marchetti, M. P., and Nevitt, G. A. (2005) Proliferation zones in the salmon telencephalon and evidence for environmental influence on proliferation rate. *Comparative Biochemistry and Physiology - A*, **141**: 327–335.
- Leong, J. S., Jantzen, S. G., von Schalburg, K. R., Cooper, G. A., Messmer, A. M., Liao, N. Y., Munro, S., Moore, R., Holt, R. A., Jones, S. J. M., Davidson, W. S., and Koop, B. F. (2010) *Salmo salar* and *Esox lucius* full-length cDNA sequences reveal changes in evolutionary pressures on a post-tetraploidization genome. *BMC Genomics*, **11**: 279.
- Lien, S., Koop, B. F., Sandve, S. R., Miller, J. R., Matthew, P., Leong, J. S., Minkley, D. R., Zimin, A., Grammes, F., Grove, H., Gjuvsland, A., Walenz, B., Hermansen, R. A., Schalburg, K. Von, Rondeau, E. B., Genova, A. Di, Samy, J. K. A., and Vik, J. O. (2016) The Atlantic salmon genome provides insights into rediploidization. *Nature*, **533**: 200–205.
- Lin, R. C., and Scheller, R. H. (2000) Mechanisms of synaptic vesicle exocytosis. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, **16**: 19–49.
- Lindsey, B. W., Di Donato, S., Kaslin, J., and Tropepe, V. (2014) Sensory-specific modulation of adult neurogenesis in sensory structures is associated with the type of stem cell present in the neurogenic niche of the zebrafish brain. *European Journal of Neuroscience*, **40**: 3591–3607.
- Majó, G., Aguado, F., Blasi, J., and Marsal, J. (1998) Synaptobrevin isoforms in secretory granules and synaptic-like microvesicles in anterior pituitary cells. *Life Sciences*, **62**: 607–616.

- Manzini, I., Heermann, S., Czesnik, D., Brase, C., Schild, D., and Ro, W. (2007) Presynaptic protein distribution and odour mapping in glomeruli of the olfactory bulb of *Xenopus laevis* tadpoles. *European Journal of Neuroscience*, **26**: 925–934.
- Marchetti, M. P., and Nevitt, G. A. (2003). Effects of hatchery rearing on brain structures of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Environmental Biology of Fishes*, **66**: 9–14.
- Mes, D., Krogh, K. Von, Gorissen, M., Mayer, I., and Vindas, M. A. (2018) Neurobiology of wild and hatchery-reared Atlantic salmon: How nurture drives neuroplasticity. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, **12**: 210.
- Mishima, T., Fujiwara, T., Sanada, M., Kofuji, T., and Kanai-Azuma, M. (2014) Syntaxin 1B, but not syntaxin 1A, is necessary for the regulation of synaptic vesicle exocytosis and of the readily releasable pool at central synapses. *PLoS ONE*, **9**: e90004.
- Misura, K. M. S., Scheller, R. H., and Weis, W. I. (2000) Three-dimensional structure of the neuronal-Sec1-syntaxin 1a complex. *Nature*, **404**: 355–362.
- Miyakoshi, Y., Nagata, M., and Kitada, S. (2013) Historical and current hatchery programs and management of chum salmon in Hokkaido, northern Japan. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **21**: 469–479.
- 宮腰靖之 (2014) Age-9 chum salmon caught in eastern Hokkaido. *北水試研報*, **85**: 33–35.
- 宮腰靖之, 藤原 真, 安藤大成, 永田光博 (2016) Return of chum salmon released from a river and a net pen in eastern Hokkaido *北水試だより*, **89**: 9–15.
- Morey, C., Kienle, C. N., Klöpper, T. H., Burkhardt, P., and Fasshaue, D. (2017) Evidence for a conserved inhibitory binding mode between the membrane fusion assembly factors munc18 and syntaxin in animals. *Journal of Biological Chemistry*, **292**: 20449–20459.
- 森田健太郎, 高橋 悟, 大熊一正, 永田 亨 (2013) 人工ふ化放流河川におけるサケ野生魚の割合推定. *日本水産学会誌*, **79**: 206–213.
- 森田健太郎, 大熊一正. (2015) サケ: ふ化事業の陰で生き長らてきた野生魚の存在とその保全. *魚類学雑誌*, **62**: 195–198.
- Morita, K., Saito, T., Miyakoshi, Y., Fukuwaka, M., and Nagasawa, T. (2006). A review of Pacific salmon hatchery programmes on Hokkaido Island, Japan. *ICES Journal of Marine Science*, **63**: 1353–1363.
- Mortensen, D. G., Wertheimer, A. C., Maselko, J. M., and Taylor, S. G. (2002) Survival and straying of Auke Creek, Alaska, pink salmon marked with coded wire tags and thermally induced otolith marks. *Transactions of the American Fisheries Society*, **131**: 14–26.
- 野川秀樹 (2010) さけます類の人工ふ化放流に関する技術小史 (序説). *水産技術*, **3**: 1–8.
- Nikonov, A. A., Finger, T. E., and Caprio, J. (2005) Beyond the olfactory bulb: An odotopic map in the forebrain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**: 18688–18693.
- Niimura, Y., and Nei, M. (2005) Evolutionary dynamics of olfactory receptor genes in chordates: interaction between environments and genomic contents. *Proceeding of National Academy of Science of the United States of America*, **102**: 6039–6044.
- Nordeng, H. (1971) Is the local orientation of anadromous fishes determined by

- pheromones? *Nature*, **233**: 411–413.
- Ochs, C. L., Suntres, T., Zygowska, A., Pitcher, T., and Zielinski, B. S. (2017) Organization of glomerular territories in the olfactory bulb of post-embryonic wild Chinook salmon *Oncorhynchus tshawytscha*. *Journal of Morphology*, **278**: 464–474.
- Onuma, T. A., Makino, K., Ando, H., Ban, M., Fukuwaka, M., Azumaya, T., and Urano, A. (2010) Expression of GnRH genes is elevated in discrete brain loci of chum salmon before initiation of homing behavior and during spawning migration. *General and Comparative Endocrinology*, **168**: 356–368.
- Osen-Sand, A., Catsicas, M., Staple, J. K., Jones, K. A., Ayala, G., Knowles, J., Grenningloh, G., and Catsicas, S. (1993) Inhibition of axonal growth by SNAP-25 antisense oligonucleotides *in vitro* and *in vivo*. *Nature*, **364**: 445–447.
- Oyler, G. A., Polli, J. W., Wilsont, M. C., and Billingsley, M. L. (1991) Developmental expression of the 25-kDa synaptosomal-associated protein (SNAP-25) in rat brain *Proceeding of National Academy of Science of the United States of America*, **88**: 5247–5251.
- Palfreyman, M. T., and Jorgensen, E. M. (2017) Unc13 aligns SNAREs and superprimers synaptic vesicles. *Neuron*, **95**: 473–475.
- Pess, G. R., Quinn, T. P., Gephard, S. R., and Saunders, R. (2014) Re-colonization of Atlantic and Pacific rivers by anadromous fishes: Linkages between life history and the benefits of barrier removal. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **24**: 881–900.
- Prescott, G. R., and Chamberlain, L. H. (2011) Regional and developmental brain expression patterns of SNAP25 splice variants. *BMC Neuroscience*, **12**:
- Quinn, T. P. (2018) The Behavior and Ecology of Pacific Salmon and Trout. Second edition. Vancouver, University of British Columbia Press. pp. 548.
- Rabin, L. A. 2003. Maintaining behavioural diversity in captivity for conservation: Natural behaviour management. *Animal Welfare*, **12**: 85–94.
- Raptis, A., Torrejón-Escribano, B., Gómez De Aranda, I., and Blasi, J. (2005) Distribution of synaptobrevin/VAMP 1 and 2 in rat brain. *Journal of Chemical Neuroanatomy*, **30**: 201–211.
- Richmond, J. E., Weimer, R. M., and Jorgensen, E. M. (2001) An open form of syntaxin bypasses the requirement for UNC-13 in vesicle priming. *Nature*, **412**: 338–341.
- Riddle, D. R., and Oakley, B. (1992) Immunocytochemical Identification of Primary Olfactory Afferents in Rainbow Trout. *The Journal of Comparative Neurology*, **324**: 575–589.
- Risinger, C., and Larhammar, D. (1993) Multiple loci for synapse protein SNAP-25 in the tetraploid goldfish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**: 10598–10602.
- Risinger, C., Salaneck, E., Söderberg, C., Gates, M., Postlethwait, J. H., and Larhammar, D. (1998) Cloning of two loci for synapse protein snap25 in zebrafish: Comparison of paralogous linkage groups suggests loss of one locus in the mammalian lineage. *Journal of Neuroscience Research*, **54**: 563–573.
- Ruiz-Montasell, B., Aguado, F., Majó, G., Chapman, E. R., Canals, J. M., Marsal, J., and Blasi, J. (1996) Differential distribution of syntaxin isoforms 1A and 1B in the rat central nervous system. *European Journal of Neuroscience*, **8**: 2544–2552.

- Sakamoto, H., Ariyoshi, T., Kimpara, N., Sugao, K., Taiko, I., Takikawa, K., Asanuma, D., Namiki, S., and Hirose, K. (2018) Synaptic weight set by munc13-1 supramolecular assemblies. *Nature Neuroscience*, **21**: 41–49.
- Sanders, J. D., Yang, Y., and Liu, Y. (1998) Differential turnover of syntaxin and SNAP-25 during synaptogenesis in cultured cerebellar granule neurons. *Journal of Neuroscience Research*, **53**: 670–676.
- Satou, M. (1990) Synaptic organization, local neuronal circuitry, and functional segregation of the teleost olfactory bulb. *Progress in Neurobiology*, **34**: 115–142.
- Salo, E. O. (1991) Life history of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). In: C. Groot, and L. Margolis (Eds.), *Pacific Salmon Life Histories* (pp. 231–310). Vancouver, British Columbia, Canada: UBC Press.
- Sutton, R. B., Fasshauer, D., Jahn, R., and Brunger, A. T. (1998) Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature*, **395**: 347–353.
- Tanaka, H., Naito, Y., Davis, N. D., and Urawa, S. (2005) Recent analyses of chum salmon homing migration from the Bering Sea to first record of the at-sea swimming speed of a Pacific salmon during its oceanic migration. *Marine Ecology Progress Series*, **291**: 307–312.
- Teng, F. H., Wang, Y., and Tang, B. L. (2001) The syntaxins. *Genome Biology*, **2**: 3012.1–7.
- Trimble, W. S., Gray, S. T., Elferink, A. L., Wilson, C. M., and Scheller, H. R. (1990) Distinct patterns of expression of two VAMP genes within the rat brain. *The Journal of Neuroscience*, **10**: 1380–1387.
- Ueda, H., Nakamura, S., Nakamura, T., Inada, K., Okubo, T., Furukawa, N., Murakami, R., Tsuchida, S., Zohar, Y., Konno, K., and Watanabe, M. (2016) Involvement of hormones in olfactory imprinting and homing in chum salmon. *Scientific Reports*, **6**: 21102.
- 上田周典, 阿部嵩志, 越野陽介, 工藤秀明 (2017) 北海道南西部の遊楽部川における産卵後斃死サケの耳石温度標識から推定した自然産卵サケの起源. *日本水産学会誌*, **84**: 7–9.
- 若菜 博 (2004) 近世日本における魚附林と物質循環. *水資源・環境研究*, **17**: 53–62.
- Wang, Y., Dong, Y., Song, H., Liu, Y., Liu, M., Yuan, Y., Ding, F., Gu, X., and Wang, Y. (2012) Involvement of gecko SNAP25b in spinal cord regeneration by promoting outgrowth and elongation of neurites. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, **44**: 2288–2298.
- Warren, I. A., Ciborowski, K. L., Casadei, E., Hazlerigg, D. G., Martin, S., Jordan, W. C., and Sumner, S. (2014) Extensive local gene duplication and functional divergence among paralogs in Atlantic salmon. *Genome Biology and Evolution*, **6**: 1790–1805.
- Wiedenmann, B., and Franke, W. W. (1985) Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38,000 characteristic of presynaptic vesicles. *Cell*, **41**: 1017–1028.
- Wisby, W. J., and Hasler, A. D. (1954) Effect of olfactory occlusion on migrating silver salmon (*O. kisutch*). *Journal of Fisheries Research Board of Canada*, **11**: 472–478.

- Yamamori, S., Itakura, M., Sugaya, D., Katsumata, O., Sakagami, H., and Takahashi, M. (2011) Differential expression of SNAP-25 family proteins in the mouse brain. *The Journal of Comparative Neurology*, **519**: 916–932.
- Yamamoto, M., and Ueda, K. (1977) Comparative morphology of fish olfactory epithelium I Salmoniformes. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, **43**: 1163–1174.
- Yamamoto, N. (2009) Studies on the teleost brain morphology in search of the origin of cognition. *Japanese Psychological Research*, **51**: 154–167.
- Yamamoto, N., Ishikawa, Y., Yoshimoto, M., Xue, H. G., Bahaxar, N., Sawai, N., Yang, C. Y., Ozawa, H., and Ito, H. (2007) A new interpretation on the homology of the teleostean telencephalon based on hodology and a new eversion model. *Brain, Behavior and Evolution*, **69**: 96–104.
- Yang, X., Wang, S., Sheng, Y., Zhang, M., Zou, W., Wu, L., Kang, L., Rizo, J., Zhang, R., Xu, T., and Ma, C. (2015) Syntaxin opening by the MUN domain underlies the function of Munc13 in synaptic-vesicle priming. *Nature Structural and Molecular Biology*, **22**: 547–554.
- Zhang, Z., Wang, D., Sun, T., Xu, J., Chiang, H.-C., Shin, W., and Wu, L. G. (2013) The SNARE proteins SNAP25 and synaptobrevin are involved in endocytosis at hippocampal synapses. *The Journal of Neuroscience*, **33**: 9169–9175.
- Zhang, Q., Yan, W., Bai, Y., Zhu, Y., and Ma, J. (2014) Repeated formaldehyde inhalation impaired olfactory function and changed SNAP25 proteins in olfactory bulb. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, **20**: 308–312.