

胎生魚クロソイ雄のフェロモン様物質に関する生物情報科学的研究

北海道大学大学院水産科学研究院 東藤 孝

本研究事業の概要: 本研究の目的は、北海道の重要な漁業対象種である胎生魚クロソイ (*Sebastes schlegeli*) の雄尿中に存在するフェロモン様物質 (タンパク質) について、生物情報科学的解析により、その構造と発現様式を遺伝子およびタンパク質の双方のレベルで明らかにすることである。本研究では、クロソイ雄尿中に見出されているフェロモン様タンパク質候補のうち、低分子量尿タンパク質 (LMWups) に着目し、①交尾期クロソイ雄の腎臓および膀胱由来 LMWups 転写産物候補の cDNA クローニングを行うとともに、クロソイの近縁種であるエゾメバル (*S. taczanowskii*) を用いて②小型長鎖シーケンサーを用いた交尾期エゾメバル雌雄腎臓転写産物のマルチプレックスストランスクリプトーム解析を実施し、以下の成果を得た。

① 交尾期クロソイ雄の腎臓および膀胱由来 LMWups 転写産物候補の cDNA クローニング: これまでの研究から、LMWups は Three finger protein (Tfp/*tfp*) スーパーファミリーに属するタンパク質であることが示されている。そこで、クロソイ 3 尾 (熊石産 2 尾、室蘭産 1 尾) の膀胱と腎臓試料から total RNA を抽出し、逆転写した cDNA をテンプレートとして、*tfp* の cDNA クローニングを行った。プライマーはクロソイリファレンスゲノム上に存在すると推定された 7 種類のリファレンス *tfp* 配列に対し、全サブタイプのコーディング配列全長を含む配列が増幅される共通配列上に設計した。クローニングにおいて、1 個体 1 組織につき 16 個のコロニーを選択し、それら由来のプラスミドを精製した後、シーケンス配列を得た。今回、良好なシーケンス結果が得られたコロニー数は、熊石個体①の腎臓で 12 個、膀胱で 13 個、熊石個体②の腎臓で 11 個、膀胱で 13 個、室蘭個体の腎臓で 11 個、膀胱で 8 個であった。これらの得られた配列は *tfp* リファレンス配列に近似していた。また、これら実際に発現している 3 個体/2 組織の *tfp* 遺伝子転写産物の総種類数は 12 個であり、リファレンス配列よりも多かった。極めて近似した *tfp* サブタイプをグループ化した結果、5 種類のグループに分類することができた。各 *tfp* グループに属したコロニー数の割合は、個体間/組織間で異なっていた。

② 小型長鎖シーケンサーを用いた交尾期エゾメバル雌雄腎臓転写産物のマルチプレックスストランスクリプトーム解析: ①の結果の通り、クロソイの腎臓や膀胱に発現するフェロモン様タンパク質の *tfp* 遺伝子には、10 数種あり、かつそれらが個体間や組織間で異なっていることが示された。そこで、今後、フェロモンとしての *tfp* 遺伝子を同定していくうえでは、迅速かつ効率的に網羅的な発現解析を行うことが極めて有用である。そこで、クロソイの近縁種であり、試

料を得ることが比較的容易なエゾメバルを用い、新規の技術である小型長鎖シーケンサーを用いたマルチプレックスストランスクリプトーム解析を実施した。野生エゾメバル雄6尾、雌6尾の計12尾の腎臓サンプルから得た total RNA を RNA-seq のための cDNA ライブラリ調製に用いた。cDNA ライブラリ調製は市販のキットを用いて行った。その調製の際、雄1~6にはそれぞれバーコード番号1~6のバーコード配列を付与し、雌1~6にはバーコード番号7~12のバーコード配列をそれぞれ付与した。調製できた12個体分のライブラリ（バーコード付与済み）を混合し、アダプター配列を付与する反応に供した。得られた反応物を実際のランに用いるサンプルとして、フローセルにアプライした。その結果、911万本（約7.05 Gbase相当）のリードがシーケンスされ、得られたリードのN50は約735 bpであった。得られたリードについてバーコード配列に基づいて仕分けた結果、全てのバーコード（バーコード番号1~12）について得られたリード数は30万~60万の範囲にあった。得られたリードの配列は polyA 配列を含むものが多数含まれており、*tfp* 転写産物全長の配列が取得されている可能性が高いことが示唆された。得られたリードの配列の一部について Genbank のデータベースにて Blast 検索を行った結果、*tfp* の配列と配列相同性を示す配列が検索された。

今後の成果利用： 本研究により、クロソイ雄尿中に存在するフェロモン様物質（LMWups）について、産生組織（腎臓・膀胱）や個体間での多様性があることが明らかとなるとともに、それらを迅速かつ効率的に解析するための新規技術が確立され、将来のフェロモンとしての機能解析に向けた重要な研究基盤が整備された。これらの成果は、フェロモンを利用した人為的な交尾行動誘起技術など新たなメバル類の繁殖制御技術の開発に繋がることが期待される。