

論文 / 著書情報  
Article / Book Information

題目(和文)	真骨魚類特異的ゲノム重複に伴うOlfactory Marker Protein遺伝子の倍化と進化
Title(English)	
著者(和文)	鈴木彦有
Author(English)	Hikoyuu Suzuki
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第10083号, 授与年月日:2016年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:二階堂 雅人,木村 宏,本郷 裕一,廣田 順二,梶川 正樹,岡田 典弘
Citation(English)	Degree:., Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第10083号, Conferred date:2016/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

(論文博士)

## 論 文 要 旨 (和文2000字程度)

(Summary)

報告番号	乙 第	号	氏 名	鈴木 彦有
------	-----	---	-----	-------

## (要 旨)

Olfactory Marker Protein (OMP)は、1972年にMargolisらによってマウスの嗅球から単離され、脊椎動物の成熟した嗅神経細胞特異的マーカーとして用いられているタンパク質である。OMPはほとんどの脊椎動物において単一の遺伝子にコードされており、進化的にも保存されているが、発見から40年以上経った現在においても詳細な機能が明らかにされていない。当研究室の先行研究では、ゲノムデータの探索からゼブラフィッシュやメダカなどの真骨魚類はOMPを2コピー保持していることが見出されていた。一般に重複遺伝子が進化の過程で保持されている場合、新規機能獲得や発現パターンの細分化などの機能分化が起きたことが期待される。そこで私は真骨魚類のOMPについて、その倍化と機能分化の様相を明らかにする目的で研究を行った。

はじめに、解析に用いるOMP配列のデータマイニングを行った。まず、遺伝子データベースからヒト、マウス、アフリカツメガエルなどのOMP全長配列を取得した。次いで、これらのアミノ酸配列をクエリーに用い、TBLASTN検索により真骨魚類6種(ゼブラフィッシュ、トゲウオ、トラフグ、メダカ、プラティ、ティラピア)、スポッテッド・ガー、四足動物などのゲノムデータを探索し、OMP全長配列を単離した。その結果、配列探索に用いた真骨魚類6種においてOMPが2コピーずつ単離された。このうち、ゼブラフィッシュのOMPは2002年にCelikらによって1コピーだけ単離されており、これと比較して配列類似性が高いものをOMP1、他方をOMP2と名付けた。

次に、真骨魚類のOMPが倍化した時期を明らかにするため、MEGA6により系統解析を行った。その結果、OMP1とOMP2はそれぞれ単系統群を形成し、かつOMP1クレードとOMP2クレードが姉妹群になったことから、真骨魚類の共通祖先において倍化したことが強く支持された。1998年のAmoresらによる*hox*クラスターの解析をはじめ、多くの先行研究から真骨魚類の共通祖先で全ゲノム重複が起きたと考えられており、これに伴ってOMPも倍化したと考えられた。このことを確かめるためシンテニーを解析した結果、いずれの種においてもOMPは別の遺伝子(CAPN5)のイントロン中に存在しており、真骨魚類ではそのシンテニーが保存されたままOMPとCAPN5が倍化したことが示された。

ここまでの解析で真骨魚類のOMPは共通祖先における全ゲノム重複に伴って倍化した可能性が強く示唆されたが、その後3億年以上経った現在も各魚種で2コピーが保持されていることから、やはり両者の間には機能分化が起きている可能性が高いと考えられた。そこで、ゼブラフィッシュ成魚を用い、OMP1とOMP2の発現パターンを解析することにより、両者の機能分化について考えた。

まず、*OMP1*、*OMP2*にそれぞれ特異的なプライマーを設計し、各組織から抽出したtotal RNAを鋳型に用いたRT-PCR法により両者の発現パターンを比較した。その結果、*OMP1*は嗅上皮のみで発現していたのに対し、*OMP2*は嗅上皮に加えて眼でも発現していた。また、*OMP2*の眼での発現は他の魚種のESTデータからも示唆された。これらのことから、組織レベルで両者の発現パターンに違いがあることが明らかになった。

さらに、全ゲノム重複以前に分岐した種であるスポットテッド・ガーは*OMP*を1コピーしか持たないが、公開されているRNA-seqデータを解析した結果、眼におけるスポットテッド・ガーの*OMP*の相対発現量はゼブラフィッシュの*OMP2*とほぼ同等であった。この結果は、*OMP*が倍化以前から眼にも発現していたことを示すとともに、四足動物において嗅神経細胞特異的な発現パターンに進化していった可能性を提示している。

次に、*OMP1*、*OMP2*にそれぞれ相補的なRNAプローブを合成し、2カラー*in situ*ハイブリダイゼーション法により嗅上皮における両者の発現パターンを比較した。その結果、*OMP1*は深層で一様に発現していたのに対し、*OMP2*は表層でまばらに発現しており、両者の発現はほとんど重ならなかった。このことから、嗅上皮では細胞レベルでも両者の発現パターンに違いがあることが明らかになった。さらに、いくつかのマーカー遺伝子と*OMP2*の発現について同様に比較した結果、*OMP2*は繊毛性嗅神経細胞のマーカーである*Gα<sub>olf2</sub>*と共発現することが示された。また、*OMP1*も*Gα<sub>olf2</sub>*と共発現することが示された。これらの結果から、*OMP1*と*OMP2*は繊毛性嗅神経細胞の中の異なる細胞群に発現していることが示唆された。おそらく、真骨魚類の共通祖先では*OMP*が繊毛性嗅神経細胞全体に発現しており、全ゲノム重複による倍化を経て、それぞれの発現パターンが細胞レベルで細分化したと推測された。

重複遺伝子の発現パターンが細分化した例はこれまでも知られていたが、従来の研究では組織レベルで示したものに限られていた。本研究により、重複遺伝子の発現パターンが細胞レベルでも細分化し得ることが示唆された。全ゲノム重複で同時多発的に倍化した遺伝子は、おそらくこのような細胞レベルでの発現パターンの細分化によっても保持され、その結果として種多様性が獲得されていくのかもしれない。

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note：Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1 copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(論文博士)

## 論 文 要 旨 ( 英 文 )

(300語程度)

報告番号	乙 第	号	氏 名	鈴木 彦有
<p>( 要 旨 )</p> <p><b>Olfactory Marker Protein (OMP) is specifically expressed in mature olfactory sensory neurons (OSNs) in vertebrates. OMP is encoded by a single-copy gene, which is highly conserved among species. In our previous study, we found that teleost fish retain two <i>OMPs</i>. Generally, retention of duplicated genes suggests functional differentiation between them. Thus, I aimed to clarify the modality of duplication and functional differentiation of teleost <i>OMP</i>.</b></p> <p><b>First, I acquired <i>OMP</i> sequences from databases using TBLASTN search. Two <i>OMP</i> sequences were found in each teleost genome data. We named the one, similar to already-known zebrafish <i>OMP</i>, as <i>OMP1</i> and the other as <i>OMP2</i>.</b></p> <p><b>Next, I performed phylogenetic analysis using MEGA6. The result suggested that teleost <i>OMPs</i> were duplicated in the common ancestor of teleost fish. Many previous studies showed that whole genome duplication (WGD) was occurred in the common ancestor of teleost fish. My synteny analysis also supported that <i>OMP</i> duplication was derived from teleost-specific WGD.</b></p> <p><b>These results made me expect that functional differentiation occurred between <i>OMP1</i> and <i>OMP2</i>. I thus examined the expression patterns of them in adult zebrafish. I performed RT-PCR with total RNA extracted from each organ as template. Distinct expression patterns between <i>OMP1</i> and <i>OMP2</i> were observed at the tissue level. <i>OMP1</i> was specifically expressed in the olfactory epithelium (OE), whereas <i>OMP2</i> was expressed in the eyes as well as OE. Then, I performed two-color <i>in situ</i> hybridization with antisense riboprobes to <i>OMP1</i> and <i>OMP2</i> using cryosectioned OE tissues. Distinct expression patterns were also observed at the cellular level in the OE. <i>OMP1</i> was uniformly expressed in the deep layer, whereas <i>OMP2</i> was sparsely expressed in the superficial layer. Their expression patterns were little overlapped.</b></p> <p><b>My study suggested that duplicated genes specialized their expression patterns at the cellular level. This mechanism might promote the retention of duplicated genes and contribute to teleost species diversity.</b></p>				

備考：論文要旨は、和文2000字と英文300語を1部ずつ提出するか、もしくは英文800語を1部提出してください。

Note: Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).