

令和元年5月30日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07469

研究課題名(和文) トゲウオ科魚類イトヨにおける季節性繁殖の平行的な喪失とその分子遺伝基盤

研究課題名(英文) Genetic mechanisms underlying parallel loss of photoperiodism and diversity of seasonal reproduction in sticklebacks

研究代表者

石川 麻乃 (Ishikawa, Asano)

国立遺伝学研究所・ゲノム・進化研究系・助教

研究者番号：20722101

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：生き物にとって「いつ繁殖するか」は適応度を左右する重要な形質です。中でも季節に応じた繁殖は、多くの生物種で獲得や喪失を繰り返し、種分化や生物多様性の創出にも貢献してきました。一方で、その重要性にもかかわらず、季節性繁殖の進化がどのような遺伝子の変化によって起こっているのかはほとんどわかっていませんでした。本研究では、日長に応じて繁殖を行う海型イトヨと、日長応答性を失って長い繁殖期間を持つ淡水型イトヨを用いてこの問題に取り組みました。その結果、甲状腺刺激ホルモン遺伝子が、イトヨの季節応答のマスター制御遺伝子として働き、その遺伝子の機能が失われることで、季節性繁殖が進化することが分かりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

甲状腺刺激ホルモンは、イトヨ以外の魚や鳥、哺乳類でも季節性繁殖の制御をおこなっていることが知られてきています。このため、イトヨ以外の他の生物でも、季節性繁殖の進化の鍵を担っていることが考えられます。この遺伝子を制御することにより、より長い期間繁殖する家畜種や養殖種の作成なども可能かもしれません。

研究成果の概要(英文)：The timing of reproduction is one of the important life history traits that influence fitness. Some organisms use photoperiods to reproduce during favorable seasons, but others lose such photoperiodism. Compared to the theoretical studies, we know little about the molecular genetic mechanisms underlying variations in the timing of reproduction. To answer these questions, we use the threespine stickleback fish as a model. Ancestral marine ecotypes generally show seasonal reproduction, whereas derived freshwater ecotypes exhibit great diversity in both the timing and duration of reproduction. Transcriptome analysis showed that TSHb2 exhibits photoperiodic change in marine ecotypes, but not in multiple freshwater populations. TALEN-induced knockdown experiments demonstrated that TSHb2 has a pleiotropic role in suppressing gonadotropic hormone expression, sex steroid hormone secretion, gonad development and body growth under short days, which may underlie their long and early reproduction.

研究分野：進化生物学

キーワード：季節性繁殖 日長応答性 甲状腺刺激ホルモン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生物を取り巻く環境は、季節に応じて大きく変動する。そのため、生物はその形態や生理、行動を日長や温度に応じて変化させる。中でも生殖タイミングをはじめとする繁殖形質は、生物の適応度を左右する最も重要な形質である。季節変動が大きな環境では、これら繁殖形質を季節に応じて変化させることが、生物の適応度を上昇させる。一方で、変動の少ない環境では、季節に関係なく長い繁殖期をもつ個体が有利になるであろう。このような季節性繁殖の多様化は自然界の地域集団間でよく見られ、繁殖時期の分化は時に種分化の引き金となり、更なる形質の多様化を引き起こす。このような重要性にもかかわらず「季節応答性の多様化がどんな遺伝的变化により進化するのか」は分かっていない。

2. 研究の目的

本研究では日長条件に応じて繁殖する海型イトヨとその日長応答性を失った淡水型イトヨをモデルとして、季節応答性の進化をもたらした遺伝基盤の実体とその進化機構を明らかにする(図1)。

トゲウオ科魚類イトヨは、氷河期以降に生じた北半球の淡水域に進出し、それぞれの生息地に合わせて様々な形質を平行的に進化させてきた(図2、3)。祖先型である海型イトヨは季節回遊性で、冬は海で生活し、春になると繁殖のため川へ遡上する。この海型の精巣発達は、顕著な日長応答性を示す。一方、淡水域で一生を送る淡水型イトヨは、この精巣発達の日長応答性を失っている。これは季節変動の少ない淡水域では、日長応答性の無い、長い繁殖期間が有利であるからだと考えられる。これらの地域集団は実験条件下で交配可能で、順遺伝学的手法を用いて集団間の形質差をもたらす遺伝基盤を同定できる。また、ゲノムが解読され、遺伝子改変技術などの逆行遺伝学的ツールも確立しているため、この問題を解く最適のモデルである。

では、具体的にどの遺伝子が日長応答性の制御と進化に関わっているのだろうか？多機能性のホルモンは古くから環境応答性の制御を担う主要調節因子とされてきた。申請者がこれまで行ってきたトランスクリプトーム解析から、イトヨにおける日長応答性とその喪失には甲状腺刺激ホルモン(*TSHB2*)が関与する可能性が高いことが分かってきた。そこで、本研究では、

- ① 季節応答マスターコントロール遺伝子 *TSHB2* の生理学的・生態学的多機能性の解析
- ② *TSHB2* の日長応答性喪失の分子遺伝基盤の解明

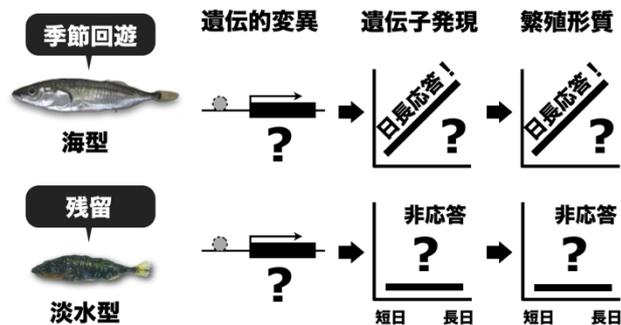


図1. 海型と淡水型に見られる季節性繁殖の変異と遺伝基盤

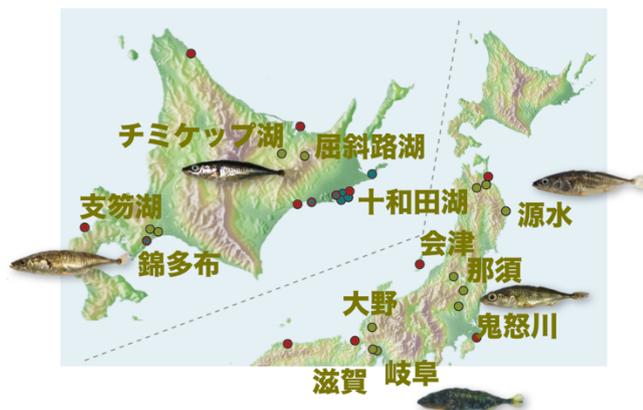


図2. 日本国内の主な淡水型集団

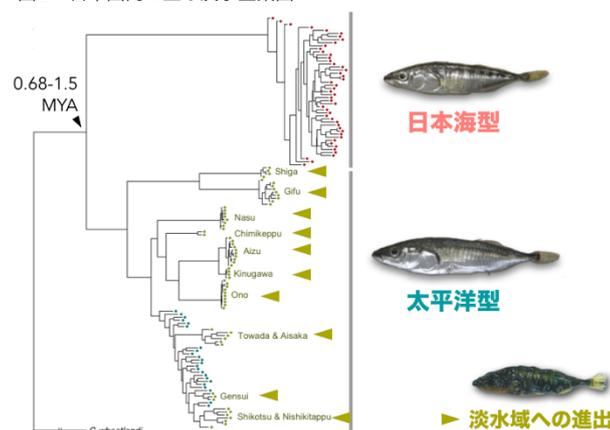


図3. 日本産イトヨの系統樹。海型である日本海型と太平洋型のうち、太平洋型から複数回淡水型が生じている (Ishikawa et al. 2019 Science in press)。

を行うことにより、季節性繁殖の進化をもたらす遺伝基盤/分子機構の一般性や共通性を理解する。

3. 研究の方法

(1) ゲノム編集を用いた *TSHB2* ノックアウトイトヨの作成と機能解析  
*TSHB2* の機能解析を行うために、TALEN コンストラクトを用いたノックアウトイトヨを作成した。日本の太平洋型を北海道厚岸町から採集し、研究室内で人工授精により得た受精卵に TALEN コンストラクトをインジェクションした。これらを 10%海水で飼育し、F0 個体を整体まで育てて、短日条件下での主要組織での遺伝子発現解析と手法ホルモン解析、繁殖開始タイミング解析を行った。

(2) *TSHB2* ノックアウトイトヨを用いた脳、下垂体での RNA シークエンス解析

(1) で作成したノックアウトイトヨから脳と下垂体を取り出し、QIAGEN の RNeasy Mini Kit と RNeasy Micro Kit を用いて RNA を抽出した。New England Biolab の NEBNext Ultra RNA Library Prep Kit for Illumina を用いて、cDNA ライブラリーを合成し、HiSeq2000 を用いて RNA シークエンス解析を行った。参照配列へのマッピングは CLC Genomics Workbench を用いた。

(3) *TSHB2* ノックアウトイトヨを用いた主要ホルモン解析

*TSHB2* の主要ホルモンに対する機能を調べるため、短日条件下の北米集団と日本集団の海型と淡水型、(1) により作成した *TSHB2* ノックアウトイトヨの甲状腺ホルモン (T3, T4)、性ホルモン (testosterone, 11KT, estradiol) を測定した。全身のホモジェネートからの各ホルモンを抽出し、MP Biomedicals 社 (甲状腺ホルモン)、Cayman Chemicals 社 (性ホルモン) の ELIZA キットを用いて測定した。ELIZA 法は、本方法に熟知した University of Alaska Anchorage の Frank A. von Hippel 教授らの協力のもとで行われた。

(4) *TSHB2* ノックアウトイトヨを用いた繁殖開始タイミング解析

(1) で作成した *TSHB2* ノックアウト個体とコントロール個体を短日条件下で制御まで育て、同時に短日条件から長日条件に移行し、オスの性成熟の指標である腎臓の発達を解析した。

(5) 下垂体培養系を用いた下垂体-性ホルモンフィードバックにおける *TSHB2* の機能解析

これまでの研究から、短日条件下での海型の高い *TSHB2* 発現量は、性成熟や成長、神経発生に対して多面的な機能を持つことが分かってきた。一般的に性成熟の制御において、下垂体から分泌される性腺刺激ホルモンと生殖腺から分泌される性ホルモンにはフィードバック機構があることが知られ、海型イトヨではそのフィードバックの方向が短日条件だと抑制的、長日条件だと促進的に切り替わることが知られていた (Shao et al. 2013 *General Comp Endocrinol*)。そこで、そのフィードバック機構における *TSHB2* の機能を調べるために、*TSHB2* ノックアウトとコントロールの下垂体を短日条件化で培養し、性ホルモンを投与して、性腺刺激ホルモンの発現量が変動するか検証した。培養液は Karigo et al. 2012 *Endocrinology* を参照し、オスの下垂体には 200ng/ml の 11KT、メスの下垂体には 20ng/ml の Estradiol を投与し、72 時間短日条件で培養したのち、Qiagen の All prep DNA/RNA Mini Kit で DNA と RNA を両方抽出した。RNA は Life technologies の SuperScript IV Reverse transcriptase で逆転写を行い、qRT-PCR で *LH* と *FSH* の発現量を定量した。また DNA は Gel Mobility Shift Assay により、*TSHB2* 遺伝子がノックアウトされているかどうか判定した。

(6) 日本集団を用いた短日条件での *TSHB2* 発現レベルに対する全ゲノム eQTL 解析

*TSHB2* の発現レベルを量的形質とみなし、その発現に影響を及ぼすゲノム上の領域を特定する eQTL (Expression Quantitative Trait Locus) 解析を行った。解析には短日条件下での北米の海型と淡水型の F2 交雑個体 200 匹と、日本の海型と淡水型のバッククロス個体 190 匹の下垂体サンプルから行った。下垂体から RNeasy Micro Kit を用いて RNA を抽出し、qRT-PCR によって *TSHB2* の発現量を解析した。また、対応する F2 交雑個体のヒレから DNA を抽出し、RAD-seq により遺伝型を決定し、R/QTL を用いて eQTL 解析を行った。

(7) 近縁種ニホンイトヨでの *TSHB2* の日長応答性の解析

*TSHB2* の日長応答性の進化過程を明らかにするために、イトヨの近縁種である日本海型 *G. nipponicus* (図 3 参照) を用いて *TSHB2* とその他の繁殖形質の日長応答性の解析を行った。人工授精により、日本海型の純系を作成し、短日条件で成魚まで成長させた。これらの下垂体を短日条件下で採取するとともに、短日条件から長日条件に日長条件を変更させ、1 日後、3 日後で下垂体を同様に採取した。これらの下垂体は RNeasy Micro Kit で保存し、解析まで -80°C のディープフリーザーで保管した。下垂体から RNeasy Micro Kit を用いて RNA を取り出し、Life technologies の SuperScript IV Reverse transcriptase で逆転写を行い、qRT-PCR で *TSHB2* の発現量を定量した。

#### 4. 研究成果

(1) 短日条件下の *TSHB2* ノックアウト個体とコントロール個体、またそれと比較するため海型と淡水型の純系の脳、下垂体を用いた RNA シークエンス解析を行った結果、脳では *TSHB2* ノックアウト個体で 66 個の遺伝子が発現変動しており、そのうち 5 個が海型と淡水型の遺伝子発現量の違いと一致していた。それらには神経発生に関わる遺伝子が含まれていた。また、脳トランスクリプトームを主成分解析すると *TSHB2* ノックアウト個体が淡水型様の発現パターンを示すことが分かった。また、下垂体では、*TSHB2* ノックアウト個体で 112 個の遺伝子が発現変動しており、そのうち 10 個が海型と淡水型の遺伝子発現量の違いと一定していた。これらには、すでに候補遺伝子解析から得られている性ホルモン関連遺伝子群とともに、食欲や成長、代謝を制御する遺伝子が含まれていた。これらのことより、海型で見られる高い

*TSHB2*発現量は、繁殖や体サイズ成長、神経発生、脳トランスクリプトームなどに対して多面的な機能を持つことで季節性繁殖を制御していると考えられた(図4)。

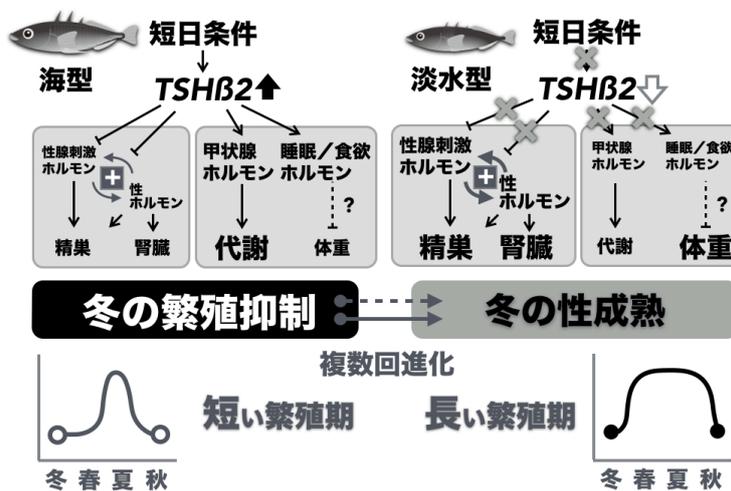


図4.海型では、多機能性の *TSHB2* の発現が日長応答することで、短い繁殖期間や急激な成長を示す回遊性生活史が実現される一方、淡水型では *TSHB2* の日長応答性が失われ、長い繁殖期と季節によらない緩やかな成長を示す残留性生活史に改変されている。

(2) 短日条件下の *TSHB2* ノックアウト個体とコントロール個体、またそれと比較するために海型と淡水型の純系を用いて雄性ホルモンである 11KT と雌性ホルモンである Estradiol、また、代謝に関わる甲状腺ホルモン T3 と T4 を測定した。11KT は海型よりも淡水型の方が高く、また *TSHB2* ノックアウト個体でも有意ではないものの、高かった。また、T4 はコントロールに比べて *TSHB2* ノックアウト個体で低く、これは海型と淡水型の傾向と一致していた。これらのことより、海型で見られる高い *TSHB2* 発現量は下流の主要ホルモンに対しても多機能的な機能を持つことで季節性繁殖を制御していることが分かった。

(3) *TSHB2* ノックアウト個体とコントロール個体を同時に短日条件から長日条件に移行すると、*TSHB2* ノックアウト個体の方が早く腎臓が成熟した。これは、淡水型が *TSHB2* の高い発現を失うことにより、より早く成熟できることを示している。

(4) *TSHB2* の下垂体-性ホルモンフィードバック機構における機能解析  
下垂体-性ホルモンフィードバック機構における *TSHB2* の機能を調べるために、*TSHB2* ノックアウトとコントロールの下垂体を短日条件化で培養し、性ホルモンを投与して、性腺刺激ホルモンの発現量が変動するかどうか検証すると、*TSHB2* ノックアウトでは、性ホルモンの投与に対して性腺刺激ホルモンの発現量が上昇したのに対し、コントロールではその上昇が見られなかった。これは、短日条件下での高い *TSHB2* 発現量が、性腺刺激ホルモンと性ホルモンの促進的なフィードバックを抑えることで、性成熟が起こらないように機能していることを示している。

(5) 日本集団の淡水型で短日条件下の *TSHB2* の eQTL 解析を再度行うと、性染色体である 19 番染色体に、短日条件下での *TSHB2* 発現量の違いを決定する遺伝子座が存在することが分かった。この遺伝子座には 36 個の遺伝子が含まれており、その中から下垂体で *TSHB2* と共発現し、特異なアミノ酸置換を含む候補遺伝子が見つかった。

(6) *TSHB2* の日長応答性の進化過程を明らかにするために、イトヨの近縁種であるニホンイトヨを用いて *TSHB2* とその他の繁殖形質の日長応答性の解析を行った。その結果、ニホンイトヨでも *TSHB2* は短日条件で高く、長日条件で発現が下がることが分かった。このことより、イトヨの祖先型は *TSHB2* の日長応答性を有しており、淡水に進出した幾つかの集団で並行的にこれらが失われたことが示唆された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12 件)

- (1) **Ishikawa A** et al. A key metabolic gene for recurrent freshwater colonization and radiation in fishes. *Science* in press 査読あり
- (2) **Ishikawa A**, Kusakabe M, Ravinet M, Yoshida K, Makino T, Toyoda A, Fujiyama A, and Kitano J. Different contributions of local- and distant-regulatory changes to transcriptome divergence between stickleback ecotypes. *Evolution* 71 (3): 565–581 (2017) 査読あり [https://doi.org/10.1111/evo.13175]
- (3) **Ishikawa A**, Kusakabe M, Kume M, and Kitano J. Comparison of freshwater tolerance during spawning migration between two sympatric Japanese marine threespine stickleback species. *Evolutionary Ecology Research* 17:525-534 (2016) 査読あり [http://www.evolutionary-ecology.com/abstracts/v17/3000.html]

他 9 件 (全て査読あり)

[学会発表] (計 2 4 件)

- (1) **Ishikawa A.** and Kitano J. "The molecular genetic mechanisms of life history evolution in sticklebacks." JEB2019: Genome editing for comparative physiology, March 23-27, 2019, Massa Marittima, Italy. [招待講演]
- (2) **Ishikawa A.** "Molecular and genetic basis underlying freshwater colonization and adaptation in sticklebacks." The 10th NIBB International practical course, September 20-29, 2018, Okazaki, Japan. [招待講演]
- (3) **Ishikawa A.** "Genetic mechanism underlying speciation and adaptation in stickleback." 14th JGFoS symposium, September 6-9, 2018, Kyoto, Japan. [招待講演]
- (4) **Ishikawa A.** and Kitano J. "A key metabolic gene for stickleback freshwater colonization." Stickleback 2018, Ninth International Conference on Stickleback Behavior and Evolution, July 3-7, 2018, Kyoto, Japan.
- (5) **Ishikawa A.** and Kitano J. "Molecular and genetic basis underlying freshwater colonization and adaptation in sticklebacks." The 1st AsiaEvo conference, April 18-20, 2018, Shenzhen, China. [招待講演]
- (6) **Ishikawa A.** and Kitano J. "Genetic mechanisms underlying variation in seasonal reproduction in sticklebacks." Congress of the European Society of Evolutionary Biology, August 20-25, 2017, Groningen.
- (7) **Ishikawa A.** and Kitano J. "Non-parallel genetic mechanisms underlying parallel loss of seasonal photoperiodism in freshwater sticklebacks." The 22nd International Congress of Zoology, November 14-19, 2016, Okinawa, Japan. [招待講演]

他 17 件

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年：  
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年：  
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号 (8 桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。