

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2022

課題番号：18K06327

研究課題名（和文）一年魚の休眠関連遺伝子の機能とその発現調節の解明

研究課題名（英文）Study of gene function and its expression for the diapause of annual killifish

研究代表者

黒川 大輔（KUROKAWA, Daisuke）

東京大学・大学院理学系研究科（理学部）・助教

研究者番号：40342779

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：東アフリカに生息するNothobranchius korthausaeという乾季に発生休止を行う一年魚を用いて、脊椎動物の発生休止メカニズムを支える分子基盤と、それらが進化上如何にして獲得されたかの解明を目指した。トランスクリプトーム解析により得られた発生休止期に高発現している発生休止に関わる可能性のある遺伝子の突然変異体をCRISPR/cas9によるゲノム編集法により作成し、一部その系統を得ることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでほとんど研究がされてこなかった脊椎動物の発生休止現象の理解をすすめるための基盤を作った。またこれらの実験を進める中で、比較的飼育の容易な東アフリカ産の一年魚Nothobranchius korthausaeの飼育技術を確立して系統を維持し、トランスジェニック魚の作成やゲノム編集法を確立した。

研究成果の概要（英文）：The diapause of vertebrate was analyzed by using annual killifish (Nothobranchius korthausae).

In order to investigate the functions of gene whose expression levels increase during diapause, we created mutants of these candidate gene by genome editing using CRISPR/Cas9.

研究分野：発生生物学

キーワード：発生休止

1. 研究開始当初の背景

発生に不利な環境において、動物の初期発生の特定の段階で胚の細胞が一斉に細胞周期を停止して代謝が非常に低い状態になる現象を発生休止(Diapause)と呼ぶ。一定期間の発生休止後、環境が整うと発生は再開する。発生休止は動物界に広く見られる現象で“生きたまま”の状態を保ちつつも細胞の活動を低下させると言う点で非常に興味深い現象である。脊椎動物においても一部のほ乳類において、哺育に適した時期に出産するように胚の着床遅延(Delayed implantation)や、本研究に用いた一部の真骨魚類等で発生休止現象が報告されているが、その分子メカニズムはほとんど解明されていない。

カダヤシ目 *Nothobranchius* 属の魚(図1)は、東アフリカの雨期乾期の明瞭な乾燥地帯に生息し、雨期に生じる水たまりで成長して産卵し、乾期になり水が干上がると成体は死んでしまうが卵は発生休止状態で乾期を過ごし、次の雨期に生じる水たまりで発生を再開して孵化・成長して産卵するというライフサイクルを持ち「一年魚(Annual killifish)」と呼ばれている。およそ40種類が知られており、国内でも熱帯魚として販売飼育されている。そのうちの一つである *N.furzeri* 種はモザンビーク、ジンバブエの広い地域に分布し、雨季が3ヶ月ほどと極めて短い地域に生息する系統は、孵化後、3週間ほどで性成熟して産卵を開始し、3ヶ月で水溜りの消失に合わせるように、骨変形や筋肉量の減少など明瞭な老化兆候を示して死んでしまう「世界一寿命が短い脊椎動物」と呼ばれている。対して、降水量が多く、水たまりが長く続く地域に分布する本種の系統は穏やかに成長し、長い水たまりの存続期間に合わせるように寿命が長い。これらの系統では乾期の長短によって胚の発生休止期間の長短も調節されている。同種でありながら、各系統間で寿命や発生休止期間が違う原因を探ることにより、老化をコントロールする遺伝学的な理由を解明できることが期待され、2000年代後半より本種が注目を浴びるようになり、2015年にゲノム配列も発表され、発生休止現象の研究も行われるようになってきた。しかし、本種は *Nothobranchius* 属中で最も飼育が難しく、研究室での維持が難しい側面があった。

このような状況の中、我々は国内の熱帯魚屋で入手可能な *Nothobranchius* 属の魚でもっと飼育が簡単な種類がないか検討し、*N.korthausae* (図1)が、メダカやゼブラフィッシュのように簡単に研究室でも維持できるとことを見出し、本種を用いて「発生休止」の分子メカニズムの研究を行ってきた。



2. 研究の目的

- (1) 発生休止に関わる遺伝子の同定し、その機能を解析すること
 - (2) 発生休止胚における細胞の振る舞いを観察すること
- の2点を目標に研究を行った。

3. 研究の方法

- (1) これまでの研究で見つかったトランスクリプトーム解析などにより、発生休止期に高発現する発生休止に関わる可能性がある遺伝子の突然変異体を、CRISPR/CAS9を用いたゲノム編集法により作成し、その機能を解析する。
- (2) 全身の核にEGFPやFucciなど各種蛍光タンパク質を発現するトランスジェニック系統をTol2トランスポゾンを使って樹立し、胚発生中の細胞の移動や、細胞周期を可視化し、観察する。

4. 研究成果

実験室の環境下では、*N.korthausae* 胚は28℃で酸素が潤沢にある水中では発生休止をしないで2週間ほどで孵化するが、100%エピポリー期に28℃から18℃に移して飼育すると30体節頃頃に一斉に発生休止することを見出した。この性質を用いて、発生休止胚を大量に得てトランスクリプトーム解析を行い、発生休止によって発現量が増加する遺伝子を網羅的に検索したところ、1)転写を抑制する遺伝子、2)細胞分裂を抑制する遺伝子、3)細胞の物理的強度に関わる細胞表面や細胞骨格に関わる遺伝子、が、発生休止胚において高発現していた。これらの遺伝子について定量的RT-PCR法やWhole mount in situ hybridization法を用いて実際に発生休止胚で発現が上昇していることを確認し、再現性が確認できた遺伝子についてはCRISPR/CAS9法を用いたゲノム編集技術により突然変異体の作製を行った。

(4) Tol2トランスポサナーゼを用いて高効率に外来遺伝子をゲノムに挿入する技術を確立し、核や細胞膜に蛍光タンパク質を発現するトランスジェニック魚の系統を確立した。核にEGFPや

FUCCI を発現する魚を用いて、休眠前後の細胞の振る舞いを共焦点レーザー顕微鏡でタイムラプス観察することに成功した(図 3)。

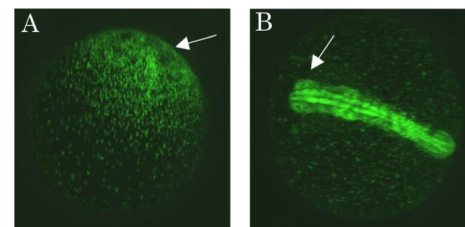


図 3. アクチンプロモーターに連結した Histone-H2B/EGFP 融合遺伝子を発現するトランスジェニック魚：全細胞の核が EGFP によって標識されている。A: 受精後 60 時間胚矢印の領域に細胞が集合している。B: 10 体節期 矢印は頭部

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shono Takanori, Thiery Alexandre P., Cooper Rory L., Kurokawa Daisuke, Britz Ralf, Okabe Masataka, Fraser Gareth J.	4. 巻 19
2. 論文標題 Evolution and Developmental Diversity of Skin Spines in Pufferfishes	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 1248 ~ 1259
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2019.06.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Kitahashi Takashi, Kurokawa Daisuke, Ogiso Shouzo, Suzuki Nobuo, Ando Hironori	4. 巻 47
2. 論文標題 Light-induced and circadian expressions of melanopsin genes opn4xa and opn4xb in the eyes of juvenile grass puffer Takifugu alboplumbeus	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fish Physiology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 191 ~ 202
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10695-020-00901-w	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 仲山 慶、池田 踏青、黒川 大輔、北條 裕也、宇野 誠一	4. 巻 25
2. 論文標題 魚類初期生活段階毒性試験の海産魚モデルとしてのクサフグの利用可能性について	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 環境毒性学会誌	6. 最初と最後の頁 1 ~ 9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11403/jset.25.1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 黒川大輔
2. 発表標題 細胞・個体の寿命を研究するためのモデル動物「一年魚」
3. 学会等名 第70回 日本実験動物学会総会（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------