

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14740

研究課題名(和文) 広塩性モデル魚メダカを用いた、適応的進化の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Molecular backgrounds for the seawater adaptation in euryhaline medaka (*Oryzias latipes*).

研究代表者

高木 互 (Takagi, Wataru)

東京大学・大気海洋研究所・助教

研究者番号：90755307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではミナミメダカを用いて、海水に移行した海水群(Group1)と、その後淡水に戻した海水経験群(Group2)、そしてそれらに対して塩分濃度以外の条件をすべて同じにした対照群(Group3,4)を用意し、鰓の遺伝子発現とクロマチン状態の変化をそれぞれRNA-seq, ATAC-seqにより解析した。その結果、遺伝子発現レベルでは、海水中と淡水中で大きな変動が見られたものの、淡水に戻した海水経験群では対照群である淡水個体と非常に似たプロファイルを示した。一方、クロマチン状態はGroup2と4で異なる状態を示しており、海水経験がクロマチンレベルで記憶されている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

国産の小型魚類メダカは、海水への適応能力が高く、海水適応機構の研究に最適なモデル生物である。本研究では、海水へ移行させた個体が淡水へと戻った後も、海水中のクロマチン状態を一定レベル保持することで、淡水で飼育を続けた個体と比べて海水適応能力を向上させる可能性が示唆された。このクロマチン状態の記憶は、高い頻度で起こる環境変化に対して有利にはたらくと考えられ、適応進化を理解する上で重要な基礎的知見である。また、最近の研究では、一度海水を経験した魚が、淡水で飼育され続けた個体と比べて、成長がよくなることが報告されており、水産増養殖への応用も期待される。

研究成果の概要(英文)：Medaka is an ideal model to study seawater adaptation of teleost fishes. In this study, the following four experimental groups were prepared: Group1, reared in seawater; Group2, transferred back to freshwater; Group3 and Group4, freshwater group control for Group1 and Group2, respectively (reared at the same condition except for salinity). The gills of each group were then analyzed by RNA-seq and ATAC-seq. At the transcriptome level, the expression profiles of Group1 and Group2 were clearly different, while the profile of Group3 strongly resembled that of Group4. Meanwhile, ATAC-seq analysis showed that the profile of the differentially accessible (DA) peaks in seawater-experienced Group2 is likely intermediate states between those of Group1 and Group3. These findings suggest that the seawater experience in medaka may be memorized at the chromatin level but not at the transcriptome level.

研究分野：魚類生理学

キーワード：エピジェネティクス 進化 海水適応 RNA-seq ATAC-seq

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

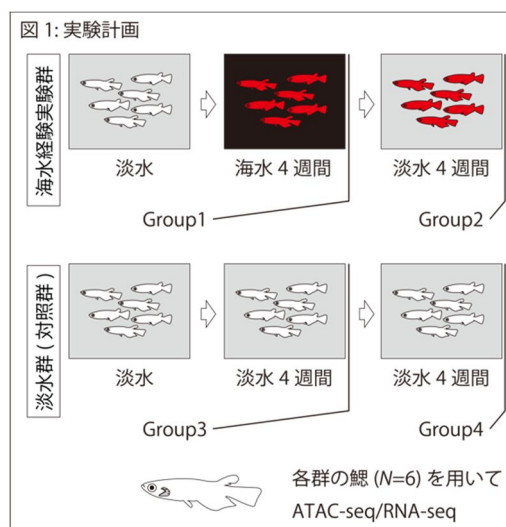
先行研究により、一世代のうちに海水を経験したメダカは、そうでない個体と比べて海水への適応能が向上することが明らかになっている(引用文献)。海水経験メダカの鰓では、再び海水へと移行した際に、塩類排出に関わる種々の遺伝子群の発現や塩類細胞数が淡水群と比較して有意に高くなる。この適応能の亢進は、異なる環境中での生存を有利にすると考えられ、多様な環境への適応放散を可能にしてきたと考えられる。しかしながら、その背景にある分子メカニズムは全く不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、多様な水圏環境に生息する真骨魚類の海水適応メカニズムについて、その背景にある遺伝子の振る舞いとエピジェネティックな制御機構を理解することである。さらに、この海水経験による影響が次世代にまで受け継がれるのかも含めて検証することを目的とした。

3. 研究の方法

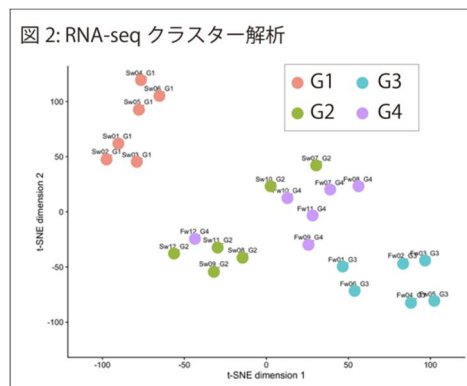
初年度には、ゲノム解読にも使用された近交系 Hd-rRII1 系統を使用して実験を開始した。しかしながら、長年の近親交配を繰り返したため、Hd-rRII1 系統は塩水への適応能力が著しく低く、移行実験に適さなかったため、ATAC-seq ライブラリ作成の条件検討のみに用い、次年度から d-rR 系統に切り替えた。飼育実験計画は図 1 に示した通りである。使用する個体を十分数確保し、同じ成長度合いの個体を使用した。海水経験実験では、淡水で飼育していた個体を 50%塩分濃度の海水で 1 日馴致させた後、海水へと移行し、4 週間飼育した後に半数を解剖した(Group1)。残りの半数は淡水へと戻し、さらに 4 週間飼育した後に解剖した(Group2)。淡水群は、海水経験実験群と塩分以外の条件はすべて同じにして飼育し、同じタイミングでサンプリングを行った(Group3, 4)。各実験群は $N=6$ 。各個体から鰓を採取し、ATAC-seq 用の生組織、RNA-seq 用の瞬間凍結、4%PFA 固定サンプルに分け、解析を行った。



4. 研究成果

先行研究での研究を再現するために、まずは海水経験した Group2 が Group4 よりも適応能力が向上しているかを確認した。それぞれの群を海水に直接移行した結果、先行研究と同様に、6 時間後生残率は Group2 で有意に上昇していることが確認された。

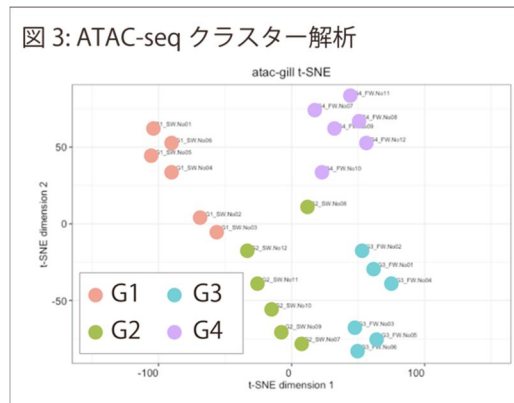
RNA-seq で読まれたリードはいずれも解析に十分なクオリティを示した。レファレンスには最新(2020 年 12 月時点)のゲノムアセンブリデータを用い、マッピング率も全てのリードで 80%以上であった。各群に含まれるサンプルの全ての遺伝子発現量データを用いて、2 次元クラスター解析を行った結果、各個体のプロファイリングは



各群に含まれるサンプルの全ての遺伝子発現量データを用いて、2 次元クラスター解析を行った結果、各個体のプロファイリングは

実験群ごとに分類された(図 2)。G1(Group1)と G3(Group3)はそれぞれ海水中と淡水中での遺伝子発現プロファイルを示すが、大きく乖離している様子が確認された。一方で、海水移行後に淡水へ戻した海水経験群 G2(Group2)と、淡水で飼育を続けた G4(Group4)の鰻での遺伝子発現は非常に近いプロファイルを示した。すなわち、遺伝子発現レベルでは、ほとんどの遺伝子で差がないことが示唆された。G1 と G3 での発現変動遺伝子を探索したところ、2945 遺伝子が上昇し、3026 遺伝子の有意な減少が見られた。上位 1500 の変動遺伝子の GO 解析を行った結果、リン酸化及び細胞内シグナル伝達に関わる遺伝子が顕著に多く含まれることを明らかにした。また、変動遺伝子の中には、既知の海水適応遺伝子である NKA, NKCC1, CFTR(塩類細胞で塩の排出に寄与する輸送体分子セット)や FOXI(塩類細胞の分化マーカー)等の G1 での発現上昇が確認された。

ATAC-seq 解析においては、先行研究により、メダカで ATAC-seq データを解析する際のレファレンス遺伝子モデル(IGDB)が構築されていたため(引用文献)、本研究でもこれを用いた。TSS(転写開始点)エンリッチメント解析の結果、いずれのリードも 3 以上のスコアを返した。低クオリティのピークが多く見られたため、本研究では $-\log_{10} > 6$ を閾値に設定し、リードのセレクションを行い、クロマチンアクセシビリティ



の変動解析を行った。G1 と G3 を比較したところ、G1 で 2606 のピーク(2214 遺伝子)が上昇し、2060 ピーク(1876 遺伝子)が減少した。RNA-seq と ATAC-seq の解析データを統合した結果、880 の遺伝子で発現及びアクセシビリティが上昇し、同時に 891 遺伝子で減少が見られた。上述の既知の遺伝子群はいずれも上昇した 880 遺伝子に含まれており、結果の妥当性が支持された。RNA-seq 解析と同様、ATAC-seq データで 2 次元クラスタ解析を行った結果を図 3 に示す。当初は、すべてのピークを用いてクラスタリングしたものの、実験群ごとにグループ化されなかったため、アクセシビリティに有意な差のあるピークのみを用いてクラスタリングした。その結果、RNA-seq の結果とは異なり、海水経験群 G2 は他のいずれの実験群(G1, G2, G3)とも異なるプロファイルを示した。クロマチンへのアクセシビリティが遺伝子発現と同じ動態を示すのであれば、G4 と似たプロファイルを示すはずだが、今回の結果から、海水経験した個体ではその経験が何らかの形で、クロマチンレベルで記憶されている可能性が示唆された。今後 G2 で有意にアクセシビリティが上昇している遺伝子を中心に、どのような適応的メカニズムが存在するかを明らかにしていく。

以上のとおり、本研究によって、海水経験の記憶がどのように保存されているかが明らかにされつつある。本研究の成果を発展させ、ロックアウト個体を用いてスクリーニングされた遺伝子群の機能を検証することで、クロマチンレベルでの記憶が維持される機構や、塩類細胞の分化誘導に関わる因子の同定にも繋げられる。また、研究予算が足らずに断念したが、本研究で当初計画していた次世代にこの記憶が引き継がれるかどうか? についても同様の解析を行うことが可能である。多様な水圏環境へ進出し、繁栄してきた真骨魚の進化プロセスの一端を明らかにできるのではないかと期待している。

< 引用文献 >

Hiroshi Miyanishi et al., 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40851-016-0047-2>

Yingshu Li et al., 2020. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.258871.119>

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Katsu Yoshinao, Kohno Satomi, Oka Kaori, Lin Xiaozhi, Otake Sumika, Pillai Nisha E., Takagi Wataru, Hyodo Susumu, Venkatesh Byrappa, Baker Michael E.	4. 巻 12
2. 論文標題 Transcriptional activation of elephant shark mineralocorticoid receptor by corticosteroids, progesterone, and spironolactone	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science Signaling	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/scisignal.aar2668	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 Imaseki Itaru, Wakabayashi Midori, Hara Yuichiro, Watanabe Taro, Takabe Souichirou, Kakumura Keigo, Honda Yuki, Ueda Keiichi, Murakumo Kiyomi, Matsumoto Rui, Matsumoto Yosuke, Nakamura Masaru, Takagi Wataru, Kuraku Shigehiro, Hyodo Susumu	4. 巻 222
2. 論文標題 Comprehensive analysis of genes contributing to euryhalinity in the bull shark, <i>Carcharhinus leucas</i> ; Na ⁺ -Cl ⁻ co-transporter is one of the key renal factors up-regulated in acclimation to low-salinity environment in bull sharks, but not in houndsharks, <i>Triakis scyllium</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Biology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jeb.201780	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 Honda Yuki, Takagi Wataru, Wong Marty K. S., Ogawa Nobuhiro, Tokunaga Kotaro, Kofuji Kazuya, Hyodo Susumu	4. 巻 223
2. 論文標題 Morphological and functional development of the spiral intestine in cloudy catshark (<i>Scyliorhinus torazame</i>)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Biology	6. 最初と最後の頁 1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jeb.225557	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 Aburatani Naotaka, Takagi Wataru, Wong Marty Kwok-Sing, Kadota Mitsutaka, Kuraku Shigehiro, Tokunaga Kotaro, Kofuji Kazuya, Saito Kazuhiro, Godo Waichiro, Sakamoto Tatsuya, Hyodo Susumu	4. 巻 37
2. 論文標題 Facilitated NaCl Uptake in the Highly Developed Bundle of the Nephron in Japanese Red Stingray <i>Hemitrygon akajei</i> Revealed by Comparative Anatomy and Molecular Mapping	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 1~1
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2108/zs200038	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0件

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高木 互 (編集: 神田真司)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 一色出版	5. 総ページ数 480
3. 書名 第二章: サメの不思議と生態 軟骨魚綱は原始的な魚なのか? 「遺伝子から解き明かす魚の不思議な世界」	

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京大学大気海洋研究所 生理学分野 http://physiol.aori.u-tokyo.ac.jp/seiri/
--

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
---------	---------