

令和 4 年 5 月 10 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16176

研究課題名(和文) FSH, LHをモデルにした重複遺伝子の独立プロセスの解明

研究課題名(英文) Elucidation of the process of duplicated gene independence using FSH and LH as a model

研究代表者

藤森 千加 (Fujimori, Chika)

東京大学・大気海洋研究所・特任研究員

研究者番号：50750775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：濾胞刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)を作る遺伝子 fshb、lhb は同一の遺伝子が重複して生まれたパラログ遺伝子である。これらの発現様式は、哺乳類では脳下垂体の同一細胞内に共発現するのに対し、真骨魚類では別々の細胞に発現している。本研究では、共発現種と別発現種の fshb、lhb のエンハンサー配列を導入したトランスジェニックメダカを作製した。脳下垂体内でレポーター活性を確認することで、進化上で発現パターンの変化がどのように起こったのか調べ、共発現種の fshb/lhb 共発現細胞と別発現種の fshb、lhb 発現細胞の対応関係を明らかにすることができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、パラログ遺伝子である fshb、lhb 進化上での発現パターンの変化について、種間での各発現細胞の対応関係を実験的に示すことができた。このことは、パラログ遺伝子が発現分化するプロセスを明らかにできた初めての例となるだけでなく、異種のエンハンサー活性をモデル動物内で再現、細胞レベルで解析することによって、進化の過程で起こった発現制御配列の進化をモデル動物上でレポーター発現として可視化する方法が有効であることを示した。

研究成果の概要(英文)：The genes fshb and lhb, which produce follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH), are paralogous genes derived from the duplication of identical genes. They are co-expressed in the same pituitary cells in mammals, whereas they are expressed in separate cells in teleost fish. In this study, we investigated how the expression patterns of fshb and lhb changed during evolution by introducing the enhancer sequences of fshb and lhb from co-expressing and differentially expressing species into medaka and checking the reporter activity in the pituitary cells of medaka. Immunohistochemistry and in situ hybridization on the same sections revealed the correspondence between fshb/lhb co-expressing cells of co-expressing species and fshb- and lhb-expressing cells of differentially expressing species.

研究分野：生殖生物学

キーワード：メダカ FSH LH ゲノム進化 エンハンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

新しい遺伝子は、多くの場合遺伝子重複によって生み出されている。重複直後、重複した2つの遺伝子は、同じ遺伝子調節配列、同じアミノ酸配列を持つため、同じ場所で発現し、同じ機能を持つ。その後に突然変異の蓄積が起こり、タンパク質コード領域の変異により異なる機能を獲得すること、発現調節配列の変異により別細胞で発現ようになること、の2つのプロセスを経てはじめて完全に異なる遺伝子として働くようになると考えられている。しかし、実際の遺伝子で、発現調節配列の変化によって発現が分化するメカニズムの研究は皆無である。その理由は、進化の速度は速く、現存する生物に存在する重複遺伝子(パラログ)の多くは、既に、のプロセスを経たファミリー遺伝子になっているからである。

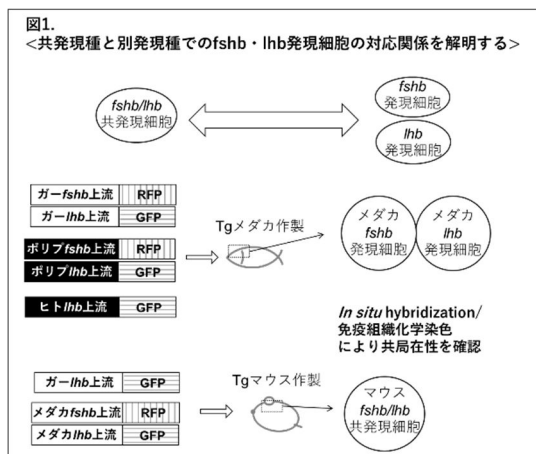
2. 研究の目的

本研究では、濾胞刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)のサブユニットをコードする遺伝子、fshb, lhb がパラログの関係にあり、現生脊椎動物で と の遷移過程にあることに着目した。これらの発現局在は、哺乳類では脳下垂体の同一の細胞に共発現しているのに対して、真骨魚類では脳下垂体の別々の細胞に発現していることが近年明らかになっている。重複直後の遺伝子は同一の細胞で発現することから考えると、共発現している哺乳類の発現パターンが祖先形質で、真骨魚類の系統で発現分化が起こったことが強く示唆される。そこで、共発現種と別発現種での fshb・lhb のレポーター発現を同一細胞内で観察することによって、共発現種と別発現種での fshb・lhb 発現細胞の対応関係の解明することを目的とした。

3. 研究の方法

fshb, lhb の発現分化前後の種における細胞の対応関係を示すために、共発現種と別発現種での fshb・lhb 上流ゲノム配列にレポーター遺伝子をつないだコンストラクトを導入した遺伝子組み換えメダカ・マウスを作製し、発現パターンを細胞レベルで解析することで、共発現種と別発現種での fshb・lhb 発現細胞の対応関係を明らかにすることを考えた。例えば、共発現種であるポリプテルス fshb 上流ゲノム配列に RFP をつないだコンストラクトを導入した遺伝子組換えメダカを作製する。そのメダカの脳下垂体で、どの細胞が RFP を発現しているか、メダカ内在性の fshb, lhb タンパク質と二重標識して観察することで、ポリプテルス fshb 発現細胞が、メダカのどの細胞に相当するのを実験的に示すことができる。

本研究では、共発現種の fshb, lhb のレポーター発現を調べるために、ポリプテルス fshb, lhb 上流ゲノム配列、ヒト lhb 配列をクローニングし、それらに GFP または RFP をつないだコンストラクトを作製、トランスジェニックメダカを作出した。また、別発現種の fshb, lhb のレポーター発現の確認のためにはスポットテッドガー fshb, lhb 上流ゲノム配列、メダカ fshb, lhb 上流ゲノム配列に GFP または RFP をつないだコンストラクトを作製した(図1)



4. 研究成果

各種トランスジェニックメダカを作製し、メダカ成体における GFP/RFP レポーター発現を検証したところ、以下のトランスジェニックメダカにおいて脳下垂体でレポーター活性が観察された。図2はその例としてポリプテルス fshb 上流 + RFP を導入したトランスジェニックメダカの脳下垂体の写真を示した。

- ・スポットテッドガー lhb 上流 + GFP
- ・ポリプテルス fshb 上流 + RFP
- ・ポリプテルス lhb 上流 + GFP
- ・ヒト lhb 上流 + GFP

これらのトランスジェニックメダカについて、in situ hybridization と免疫組織化学染色による同一切片での検出を行い、レポーター発現の見られた細胞を詳細に同定することができた。一方で、スポットテッドガー fshb 上流 + RFP を導入したトランスジェニックメダカでは脳下垂体における蛍光が見られなかったため、このゲノム配列にはメダカの脳下垂体で発現する

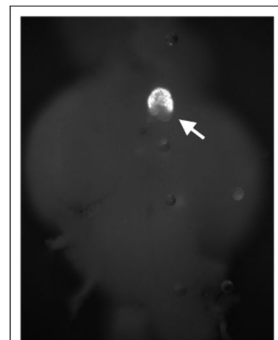


図2.
ポリプテルス fshb 上流 + RFP
Tgメダカの脳下垂体(矢印部分)

のに十分な領域が含まれていなかったことが予想された。

また、本研究とこれまでの報告から上流ゲノム領域にエンハンサー配列が含まれていることが判明しているメダカ fshb, lhb 上流配列、スポットテッドガー lhb 上流配列にレポーター遺伝子をつないだコンストラクトを導入したトランスジェニックマウスの作製を行ったが、調べた個体では脳下垂体でのレポーター発現を確認することができなかった。したがって、FSH・LH が別発現しているスポットテッドガー、メダカではエンハンサー活性は保存されているが、これらのエンハンサーはマウスでは活性を持たず、発現システムの変化が起こっていることが予想された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤森千加、杉本航平、佐野香織、神田真司
2. 発表標題 真骨魚類の進化における脳下垂体を制御するGnRHの発現変化メカニズム
3. 学会等名 第92回日本動物学会オンライン米子大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤森千加、杉本航平、寺尾美穂、高田修治、木村敦、佐野香織、加用大地、岡良隆、神田真司
2. 発表標題 非モデル魚のシステムをモデル魚上で遺伝子工学的手法により模倣する -進化上でのFSH・LH産生細胞の分化と脳下垂体制御に関わるGnRHパラログの変化の原因を探る-
3. 学会等名 第91回日本動物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 藤森千加
2. 発表標題 下垂体ホルモン遺伝子POMCの繁殖期特異的な性的二型 -その調節機構と意義-
3. 学会等名 新学術領域研究「性スペクトラム -連続する表現型としての雌雄」第3回領域会議
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤森千加、望月由子、井尻成保、藤本貴史、神田真司
2. 発表標題 ピラニアとスポッテッドガーの精子凍結保存法の確立
3. 学会等名 Cryopreservation Conference 2019
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Tokiro Ishikawa, Yu Murakami, Chika Fujimori, Masato Kinoshita, Kiyoshi Naruse, Shinji Kanda	4. 発行年 2022年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 185-213
3. 書名 Laboratory Fish in Biomedical Research Chapter 9 - Medaka as a model teleost: characteristics and approaches of genetic modification	

〔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
---------	---------