

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：34204

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22426

研究課題名(和文)新しい脊椎動物モデル・キンギョの変異体の表現型多様性を作り上げる分子機構の理解

研究課題名(英文) Understanding the molecular mechanisms which generate phenotypic diversity in goldfish mutants

研究代表者

大森 義裕 (Omori, Yoshihiro)

長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部・教授

研究者番号：90469651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：キンギョはフナを原種とし、約1000年前の中国で育種が始まった。キンギョはその育種の歴史の中で様々な品種が作出され、形態的な表現型の多様性やウロコや体色の変化を含む様々な表現型が見られる変異体であり相互に交配が可能である。キンギョ変異体の表現型の中には、ゼブラフィッシュやメダカでは見られない表現型が多く存在し、その分子メカニズムを解明することで脊椎動物に共通する形態や体色の発生の分子メカニズムが明らかになることが期待される。本研究では、キンギョ品種のもつ表現型の原因遺伝子の同定と分子メカニズムの解明を行う。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多用なキンギョ品種に見られる変異体の分子メカニズムを解明することで、私たちヒトや哺乳類一般を含む脊椎動物に共通する形態や体色の発生の分子メカニズムが明らかになることが期待される。また、硬骨魚類の進化の研究に貢献すると考えられる。例えば、キンギョではヒレの過剰な伸長を持つ品種があるが、これはソードテールという種では、一般的に見られる形質である。これら硬骨魚類の形態形成を制御するメカニズムの解明に繋がれば比較ゲノムの観点からも意義深い。さらに、キンギョは全ゲノム重複を約1400万年前に経験しており、全ゲノム重複後の進化という点からも興味を持たれる。

研究成果の概要(英文)：Goldfish is derived from crucian carp, and its breeding started in China approximately 1,000 years ago. The goldfish mutants have a variety of phenotypes including a diversity of morphological phenotypes. Among the phenotypes of the goldfish mutants, there are many phenotypes that are not found in zebrafish and medaka. Elucidating the molecular mechanisms of these phenotypes will reveal the molecular mechanisms of morphology and body-color development in vertebrates. In this study, we will identify the genes responsible for the phenotypes in the goldfish strains and elucidate the molecular mechanisms.

研究分野：基礎医学、発生生物学、ゲノム科学

キーワード：ゲノム進化 脊椎動物 形態形成

1. 研究開始当初の背景

キンギョはフナを原種とする観賞魚であり、約 1000 年前の中国宋の時代から育種が始まり、日本には室町時代に伝来している。キンギョはその育種の歴史の中で様々な品種が作出され、現在、デメキンやランチュウをはじめとした 80 系統以上の品種が存在する。これらの品種は、体形やヒレ、目の形など形態的な表現型の多様性やウロコや体色の変化を含む様々な表現型が見られる変異体であり、相互に交配が可能である (総説:Omori J Biochem. 2018)。更に、キンギョは全ゲノム重複を約 1400 万年前に経験しており、脊椎動物では最も最近に全ゲノム重複を起こした種のひとつとして知られ、全ゲノム重複後の進化という点からも興味もたれている。これまでに、キンギョゲノムが解読されてこなかったことから、これらの責任遺伝子を同定することは困難であったが、私たちは米国 NIH の研究者と共同研究により、キンギョゲノムの解読を行いキンギョ全ゲノム遺伝子配列を発表した (Chen and Omori Science Advance 2019)。このことにより、キンギョの表現型を規定する遺伝子の同定に向けて道が開けた。表現型を規定する原因遺伝子を同定するには一般に全ゲノム関連解析 (Genome Wide Association Study ;GWAS) という手法が用いられる。私たちの研究により、この手法がキンギョ表現型の遺伝子同定に適用可能となった。

2. 研究の目的

近年、脊椎動物の発生モデルとしてゼブラフィッシュやメダカによる大規模なスクリーニングが行われ、脊椎動物に共通する発生の分子メカニズムが明らかにされてきたが、キンギョの変異体の表現型の中には、ゼブラフィッシュやメダカでは見られない表現型が多く存在し、その分子メカニズムを解明することで脊椎動物に共通する形態や体色の発生の分子メカニズムが明らかになることが期待される。同時に、キンギョで見られる表現型は、硬骨魚類のいくつかの種で見られる表現型と共通する部分がある。キンギョの形態を研究することで硬骨魚類の形態形成を制御するメカニズムの解明に繋がる可能性を秘めており、比較ゲノムの観点でも興味深い。

3. 研究の方法

様々な表現型を持つキンギョ品種の雑種交配により、F1 世代を作製した。さらに戻し交配や F1 世代同士の交配により F2 世代を作出した。F2 世代の組織を採取し DNA 精製カラムを用いてゲノム精製を行った。全ゲノムシーケンスと RADseq による次世代 DNA シーケンサーを用いた解析を行った。電気泳動により、20kb 以上の高純度な DNA が精製されていることを確認した。Qbit 解析により正確な DNA の定量を行いサンプルを調整した。さらに、表現型をもつキンギョの組織を単離し、ホモゲナイザーで組織を破碎し AGPC 法 (acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction) により RNA を精製した。電気泳動により RNA の精度を確認したところ精度の高い RNA であることが確認できた。こうして得られた材料を元に複数個体の野生型と変異体の RNAseq 解析を進めた。FASTQ ファイルから HISAT2 により私たちの構築したキンギョゲノムの Refseq に対してマッピングを行った。fpkm 値をカウントし遺伝子発現量を比較した。

4. 研究成果

本研究では、新しい脊椎モデルとしてのキンギョの解析と表現型の多様性を作り上げるメカニズムの解明を行った。まず、キンギョ全ゲノム解読を完了し、論文発表を行った (Chen, Omori et al., Science Advances 2019)。キンギョ品種のゲノム解析については、様々な表現型をもつキンギョ品種の全ゲノム再シーケンス解析を行った。得られたデータを用いて、ゲノムワイド関連解

析を行うことで、出目表現型、longfin 表現型、アルビノ、背ビレ欠損、ハートテールの5つの表現型に関連する6つの遺伝子座 (lrp2a, kcnk5b, oca2S, oca2L, lrp6, rpz) を新たに同定した。これらの領域から原因遺伝子と予想される候補遺伝子を見出した。また、キングョゲノム中に存在するトランスポゾン解析によりキングョのゲノムに、1400 万年前に起きた全ゲノム重複後に非対称サブゲノム進化が起きていることを見出した (Kon et al., Current Biology 2020)。一方、キングョ品種の雑種交配による表現型と関連する遺伝子の同定に関しては、雑種交配により得られた F1 同士を掛け合わせ F2 世代を得ることに成功した。F2 世代のキングョ個体からゲノムを精製して次世代シーケンサーで解析を行い、ゲノムワイド関連解析 (GWAS) などのバイオインフォマティクス手法を使って、表現型と関連する遺伝子座の解析を進めた。また、新たな品種の個体からゲノムを精製し、得られたデータをこれまでのデータと統合したかたちで GWAS 解析もすすめている。キングョゲノムとコイゲノムとの比較をすすめ、非対称サブゲノム進化についてより詳細な解析を行った。一方で、ゼブラフィッシュを用いて、キングョで見つかった遺伝子と表現型の因果関係を、ゲノム編集の手法を用いて解析を行った (Kon et al., Current Biology 2020)。これらのデータを元に変異体における原因遺伝子の同定や分子メカニズムの解明をすすめている。また、これまでに得られた品種間におけるゲノムワイド関連解析のデータの情報学的解析も継続して行っている。これらの解析によって得られた結果をもとに学会発表を行った。また、本プロジェクトの解析から得られた情報をもとに、一般に向けたキングョの遺伝学に関する単著の書籍を執筆中である (2022 年夏出版予定)。本プロジェクトによって得られた研究内容を元にした論文の執筆も進めており、近くこれを学術論文として投稿する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Wen Ming, Feron Romain, Pan Qiaowei, Guguin Justine, Jouanno Elodie, Herpin Amaury, Klopp Christophe, Cabau Cedric, Zahm Margot, Parrinello Hugues, Journot Laurent, Burgess Shawn M., Omori Yoshihiro, Postlethwait John H., Schartl Manfred, Guiguen Yann | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Sex chromosome and sex locus characterization in goldfish, <i>Carassius auratus</i> (Linnaeus, 1758) | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 BMC Genomics | 6. 最初と最後の頁 552-564 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12864-020-06959-3 | 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 Kon Tetsuo, Omori Yoshihiro, Fukuta Kentaro, Wada Hironori, Watanabe Masakatsu, Chen Zelin, Iwasaki Miki, Mishina Tappei, Matsuzaki Shin-ichiro S., Yoshihara Daiki, Arakawa Jumpei, Kawakami Koichi, Toyoda Atsushi, Burgess Shawn M., Noguchi Hideki, Furukawa Takahisa | 4. 巻 30 |
| 2. 論文標題 The Genetic Basis of Morphological Diversity in Domesticated Goldfish | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Current Biology | 6. 最初と最後の頁 2260 ~ 2274. e6 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2020.04.034 | 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 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 大森義裕 | 4. 巻 6 |
| 2. 論文標題 キングョの遺伝子は普通の魚の約2倍！キングョが様々な形や色を持つ理由 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 月刊アクアライフ増刊、きんぎょ生活 | 6. 最初と最後の頁 60 ~ 62 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 査読の有無 無 |
| 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 大森 義裕 | 4. 巻 71 |
| 2. 論文標題 連載講座 生命科学を拓く新しい実験動物モデルー キングョの多様な表現型と全ゲノム重複-疾患モデル動物としての展開 | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 生体の科学 | 6. 最初と最後の頁 68 ~ 73 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.2425201122 | 査読の有無 無 |
| 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 - |

| | |
|---|------------------------|
| 1. 著者名 Chen Zelin, Omori Yoshihiro, Koren Sergey, Shirokiya Takuya, Kuroda Takuo, Miyamoto Atsushi, Wada Hironori, Fujiyama Asao, Toyoda Atsushi, Zhang Suiyuan, Wolfsberg Tyra G., Kawakami Koichi, Phillippy Adam M., Mullikin James C., Burgess Shawn M., NISC Comparative Sequencing Program | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 De novo assembly of the goldfish (<i>Carassius auratus</i>) genome and the evolution of genes after whole-genome duplication | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Science Advances | 6. 最初と最後の頁 eaav0547 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/sciadv.aav0547 | 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 |

〔学会発表〕 計8件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 4件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 今鉄男、大森義裕 |
| 2. 発表標題 Understanding of molecular mechanisms underlying on morphological diversity of goldfish (<i>Carassius auratus</i>) strains |
| 3. 学会等名 2020年 日本分子生物学会大会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 今鉄男、大森義裕 |
| 2. 発表標題 A data-scientific approach toward understanding of the goldfish genome and morphological diversity |
| 3. 学会等名 International Symposium: Global Collaboration on Data beyond Disciplines (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yoshihiro Omori, Tetsuo Kon, Kentaro Fukuta, Hironori Wada, Masakatsu Watanabe, Zelin Chen, Koichi Kawakami, Takahisa Furukawa, Atsushi Toyoda, Shawn Burgess, Hideki Noguchi |
| 2. 発表標題 Goldfish genome resequencing and the phenotypic variations of domesticated strains |
| 3. 学会等名 The 14th International Zebrafish Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 YOSHIHIRO OMORI, Tetsuo Kon, Kentaro Fukuta, Zelin Chen, Hironori Wada, Masakatsu Watanabe, Hideki Noguchi, Asao Fujiyama, Atsushi Toyoda, Koichi Kawakami, Shawn Burgess, Takahisa Furukawa |
| 2. 発表標題 キンギョの全ゲノム配列決定と品種に見られる多様な表現型を規定する遺伝子の探索 |
| 3. 学会等名 第42回 日本分子生物学会年会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 YOSHIHIRO OMORI, Tetsuo Kon, Kentaro Fukuta, Hironori Wada, Masakatsu Watanabe, Zelin Chen, Koichi Kawakami, Takahisa Furukawa, Hideki Noguchi, Shawn Burgess, Atsushi Toyoda |
| 2. 発表標題 キンギョ品種の形態形成を制御するメカニズムの解析 |
| 3. 学会等名 第52回 日本発生生物学会大会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yoshihiro Omori, Tetsuo Kon, Kentaro Fukuta, Atsushi Toyoda, Hideki Noguchi |
| 2. 発表標題 Diversity of morphological phenotypes in domesticated goldfish strains and their whole genome analysis |
| 3. 学会等名 The 2nd AsiaEvo Conference 2021 (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Yoshihiro Omori, Tetsuo Kon, Kentaro Fukuta, Mari Nishino, Natsuki Noda, Atsushi Toyoda, Hideki Noguchi |
| 2. 発表標題 キンギョ (<i>Carassius auratus</i>) とその近縁種、そして全ゲノム重複後の進化 |
| 3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会 ワークショップ (招待講演) (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--------------------------------|
| 1. 発表者名 大森義裕 |
| 2. 発表標題 公開講演会「今!キングヨがおもしろい」 |
| 3. 学会等名 日本動物学会 中部支部会 (招待講演) |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|---|-----------------|
| 1. 著者名 Yoshihiro Omori | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 Springer Protocols | 5. 総ページ数 17 |
| 3. 書名 zebrafish: The genetics and genome analysis of domesticated goldfish strains with a wide variety of phenotypes | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

| |
|---|
| <p>長浜バイオ大学大学院 ゲノム機能科学研究室 (大森研) のホームページ https://yoshihiroomori.web.fc2.com/</p> |
|---|

| 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 |
|---------|---------|

| | | | | |
|------|------|--|--|--|
| 米国 | NIH | | | |
| フランス | INRA | | | |