

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：13801

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06720

研究課題名（和文）広塩性魚イトヨにおける浸透圧調節能の多様化のメカニズムの解明

研究課題名（英文）Mechanisms of osmoregulatory diversification in stickleback

研究代表者

日下部 誠（Kusakabe, Makoto）

静岡大学・理学部・教授

研究者番号：40451893

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）：生物の浸透圧調節機構の解明は、種の進化と多様性を理解する上で重要な研究課題である。本研究では、異なる浸透圧調節能を保持する岐阜ハリヨと大野イトヨを用いてゲノムワイドな比較解析を行い、浸透圧調節能の多様化メカニズムの解明を目指した。鰓のイオン輸送体・チャネル遺伝子の発現パターンを解析した結果、魚類の浸透圧調節では着目されていなかったイオン輸送体・チャネル遺伝子が岐阜ハリヨと大野イトヨ間で異なる発現を示した。特に複数のカリウムの輸送に関わる遺伝子がリストに上がった。浸透圧調節能の多様性を解明するためには、Na⁺やCl⁻以外のイオンの制御機構を総合的に解析する必要があることを示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水棲生物が保持する様々な塩分環境に適応する能力（浸透圧調節能）は、生息域の拡大を可能とさせ、種の繁栄に強い影響力を持つ。魚類は、海洋という開かれた領域を利用することができれば、地球上の水のあるすべての場所に生息域を広げることができる。浸透圧調節能の違いを生じさせる生理基盤とそれを制御する遺伝基盤を明らかにすることにより、魚類の生息域が多様化している理由を説明することができる。本研究で用いているイトヨは淡水域に進出した後、海水適応能を失った集団も存在する。既に保持していた広塩性を失うことの生理学的意義を明らかにすることにより、種分化のメカニズムの一端も明らかにできる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Elucidating the control mechanisms of osmoregulation in organisms is an important topic for understanding the evolution and diversity of species. In this study, we performed a genome-wide comparative analysis using Gifu and Ono threespine stickleback, which possess different osmoregulatory abilities, aiming to elucidate the mechanism of diversification of osmoregulatory mechanisms. As a result of analyzing the expression patterns of ion transporter/channel genes in the gills, several ion transporter/channel genes, which have not been studied previously, showed significantly different expression patterns between Gifu and Ono threespine stickleback. Notably, genes involved in multiple potassium transporters were listed. We found that a comprehensive analysis of the control mechanisms of various ions is necessary to elucidate the diversity of osmoregulatory ability.

研究分野：魚類生理学

キーワード：イトヨ 広塩性 浸透圧調節 鰓 ナトリウム カリウム イオン輸送体 イオンチャネル

1. 研究開始当初の背景

北半球の亜寒帯に分布するトゲウオ科魚類イトヨは、様々な塩分環境に広く生息している広塩性魚である。イトヨは、サケ科魚類と同様に川で生まれた稚魚が海へ下って成長し、産卵のために河川を遡る生活史を持つ遡河型と海に降りずに淡水域に留まって成長する淡水型が存在する。我々は先行研究により、イトヨが淡水域に進出した後に海水耐性を急速に失う事例を複数集団で見出し、イトヨの浸透圧調節の能力が進化と適応の過程で多様化していることを見出した。

淡水への進出後に、それまで保持していた海水適応能を失うことのトレードオフとして得られる利益は未解明である。そこで本研究は、集団間で浸透圧調節能に違いがあるイトヨを用いて、浸透圧調節の多様化に関わる原因遺伝子を明らかにし、その生理的機能の解明を目指した。この疑問に答えることができれば、真骨魚類が様々な塩分環境に進化を遂げることが出来た理由の一端を説明する知見を得ることができる。

遡河型と淡水型イトヨには、異なる塩分環境に移行した時に体液の浸透圧を調節する能力に大きな違いがある集団が存在する (Ishikawa et al. 2013 *J Evol Biol*, Kusakabe et al. 2014 *Gen Comp Endocrinol*, Kusakabe et al. 2019 *Evol Ecol Res*)。我々の先行研究において、遡河型と淡水型イトヨを用いて、海水暴露後の血中ナトリウム量(体液浸透圧の指標)を表現型とした量的形質遺伝子座(QTL)解析を実施した。その結果、16番染色体が血中ナトリウム量の調節とリンクしていることを明らかにした (Kusakabe et al. 2017 *Mol Ecol*)。この研究は、16番染色体に存在する浸透圧調節候補遺伝子 (*cln5*, *calcr1*, *igfbp5*, *gdp-like*, *brp44*, *atp5g3*, *ndufa10*) の絞り込みにつながった (Kusakabe et al. 2017 *Mol Ecol*)。真骨魚類の浸透圧調節の研究は従来、塩類の排出と取り込みに関わるイオン輸送体・チャネルを中心に行われてきた。鰓のナトリウムポンプ Na^+/K^+ -ATPase (*atp1a*) を駆動力として、 Na^+ - Cl^- -共輸送体 (*slc12a10*)、 Na^+/H^+ -交換輸送体 (*slc9a3*)、 Na^+ - K^+ - 2Cl^- -共輸送体 (*slc12a2*)、嚢胞性線維症膜貫通調節因子 (*cftr*) などが連動することによって体液の浸透圧が維持される (Hiroi and McCormick 2012 *Respir Physiol Neurobiol*)。しかしながら、QTL解析から得られた候補遺伝子に、浸透圧調節を制御する重要な因子であるイオン輸送体・チャネルが含まれていなかった。

イトヨは、これまで行動学と遺伝学のモデル種として多くの研究がなされてきた。しかしながら、浸透圧調節を制御するメカニズムに関する生理学的な知見は、サケやテラピアなどの浸透圧研究のモデル種と比較すると圧倒的に少ない。イトヨにおける広塩性の制御機構を理解する上で鰓のイオン輸送体・チャネルの動態を理解する必要がある。そこで本研究では、浸透圧調節能が異なるイトヨを用いて海水に馴致する過程で、鰓のイオン輸送体・チャネルの発現変化と発現調節機構をゲノムワイドな手法も用いて比較し、浸透圧調節能に多様性が生じるメカニズムを解析した。

2. 研究の目的

本研究は、イトヨの鰓における浸透圧調節メカニズムの基盤を明らかにすることを最初の目的に設定した。そこから得られた結果をもとに生理学と遺伝学を融合した手法により、浸透圧調節因子について最新のゲノミクス的手法を用いて「調節因子の機能解析とエンハンサー領域の解析」を行い、浸透圧調節能の多様化の遺伝機構を解き明かすことを最終的な目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、(1)浸透圧調節能の異なる集団のイトヨの鰓におけるイオン輸送体・チャネルの発現動態を解析し、次に(2)浸透圧調節に関わる遺伝子の発現調節領域の役割を分子レベルで解析し、浸透圧調節能が多様化するメカニズムの解明につなげることを目指した。

日本には多数の淡水型イトヨ集団が存在する。日本におけるイトヨの淡水進出は、大まかに3回に分かれるとされている。最も古い第1波が約17万年前、第2波が10万年前、第3波が約2万年前に淡水域に進出したと推定されている (Kakioka et al. 2020 *BMC Evol Biol*)。本研究では、第1波で淡水に進出した岐阜集団(岐阜ハリヨ)と第2波で淡水に進出した福井集団(大野イトヨ)の2集団に着目して実験を行った。先行研究により、岐阜ハリヨと大野イトヨは異なる浸透圧調節能を保持していることが明らかになっている (Kusakabe et al. 2019 *Evol Ecol Res*)。岐阜ハリヨと大野イトヨをそれぞれ50%海水に馴致した後、100%海水に移行すると、大野イトヨは100%海水の環境に問題なく適応できる。一方、岐阜ハリヨは、100%海水の環境に適応できず生存できない。この2種類の淡水イトヨ集団の浸透圧調節の制御メカニズムについて比較解析を行った。

(1) 岐阜ハリヨと大野イトヨの鰓における浸透圧調節関連遺伝子の発現解析

岐阜ハリヨは、50%海水(体液浸透圧の1.7倍程度の塩分濃度)までは問題なく生息できることが分かっている (Kusakabe et al. 2019 *Evol Ecol Res*)。そこで、岐阜ハリヨと大野イトヨを50%海水に馴致し、鰓をサンプリングした。鰓に発現する主要なイオン輸送体・チャネルと先行研究のQTL解析から得られた候補遺伝子の発現をリアルタイム定量PCR法により解析した。岐阜ハ

リヨの淡水飼育群と 50%海水飼育群、大野イトヨの淡水飼育群と 50%海水飼育群の合計 4 群に分けて解析を進めた。解析を行った遺伝子のリストは以下の表 1 に示す。

表 1 . 浸透圧調節に関わる主要なイオン輸送体・チャネルと QTL 解析から得られた浸透圧調節候補遺伝子 (Kusakabe et al. 2017 *Mol Ecol*) のリスト

Gene name	Gene ID	Description
<i>atp1a1a.2-201</i>	ENSGACT00000018945.1	Sodium Potassium ATPase Alpha 1-subunit
<i>atp1a1a.2-204</i>	ENSGACT00000018961.1	Sodium Potassium ATPase Alpha 1-subunit
<i>atp1a2</i>	ENSGACT00000023416.1	Sodium Potassium ATPase Alpha 2-subunit
<i>atp1a3a</i>	ENSGACT00000002561.1	Sodium Potassium ATPase Alpha 3-subunit
<i>atp1a3b</i>	ENSGACT00000012616.1	Sodium Potassium ATPase Alpha 3-subunit
<i>slc4a4a</i>	XM_040195345.1	Sodium bicarbonate cotransporter (NBC)
<i>slc9a3</i>	XM_040189088.1	Sodium-hydrogen exchanger 3 (NHE3)
<i>slc12a2</i>	XM_040194636.1	Sodium potassium chloride co-transporter 1 (NKCC1)
<i>slc12a10-like1</i>	ENSGACT00000025118.1	Sodium-chloride cotransporter (NCC-like1)
<i>slc12a10-like2</i>	ENSGACT00000025101	Sodium-chloride cotransporter (NCC-like2)
<i>cftr</i>	XM_040164060.1	Chloride channel (CFTR)
<i>calcr1</i>	ENSGACT00000002347	Calcitonin receptor-like
<i>igfbp5</i>	XM_040201921.1	Insulin-like growth factor binding protein 5
<i>atp5a5</i>	ENSGACT00000006077	ATP synthase
<i>mpc2</i>	ENSGACT00000004297	Mitochondrial pyruvate carrier 2
<i>ndufa10</i>	ENSGACT00000011256	NADH dehydrogenase 1 alpha subcomplex
<i>cln5</i>	ENSGACT00000002347	Ceroid-lipofuscinosis
<i>bbs5</i>	XM_040201370.1	Bardet-Biedl syndrome 5

(2) 50%海水馴致後の岐阜ハリヨと大野イトヨの鰓を用いた RNA-seq および ATAC-seq 解析

実験 (1) から得られた 4 群の鰓 RNA サンプルをそれぞれ 4 尾ずつ RNA-seq および ATAC-seq に供した。RNA-seq については、岐阜ハリヨ淡水群-大野イトヨ淡水群の比較、岐阜ハリヨ 50%海水群-大野イトヨ 50%海水群の比較を重点的に行い、特にイオン輸送体・チャネルについて有意に発現が異なる遺伝子のリストを作成した。ATAC-seq は、RNA-seq に用いた実験群から鰓サンプルを採取し、岐阜ハリヨ淡水群、大野イトヨ淡水群、岐阜ハリヨ 50%海水群、大野イトヨ 50%海水群の 4 実験群についてそれぞれ 4 尾のサンプルを用いて ATAC-seq を行った。得られた結果について、まず始めにリアルタイム定量 PCR あるいは RNA-seq により、岐阜ハリヨと大野イトヨ集団間で有意に発現量が異なるイオン輸送体・チャネルのオープンクロマチン領域の分布を解析した。その後、すべての遺伝子について、岐阜ハリヨと大野イトヨにおけるオープンクロマチン領域の違いを網羅的に解析した。

4 . 研究成果

(1) 岐阜ハリヨと大野イトヨの鰓における浸透圧調節関連遺伝子の発現解析

岐阜ハリヨと大野イトヨを 50%海水に移行した後、鰓に発現する表 1 の遺伝子の変化を解析した。大きく分けると 3 つのパターンが認められた。岐阜ハリヨと大野イトヨ間で発現量に差はなく、50%海水馴致後も遺伝子の発現量に変化がない。岐阜ハリヨと大野イトヨ間で発現量に差はないが、50%海水馴致後に遺伝子の発現量が有意に増加あるいは減少する。50%海水馴致後、岐阜ハリヨと大野イトヨ間で発現量に差がある。浸透圧調節能の多様性を理解するために、に該当する遺伝子に着目した (図 1) 。

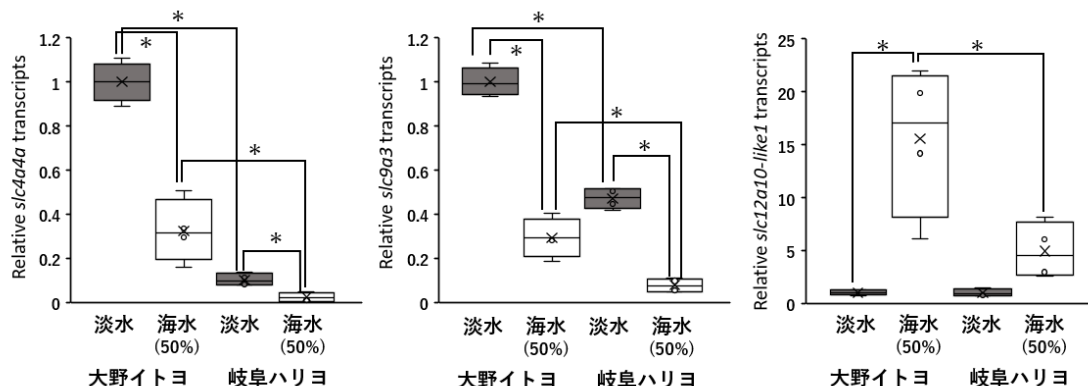


図 1 . 岐阜ハリヨと大野イトヨの 50%海水馴致後の *slc4a4a*、*slc9a3*、*slc12a10-like1* 発現量

50%海水馴致後、岐阜ハリヨと大野イトヨ間で発現量に有意な違いが認められたのが *slc4a4a*、*slc9a3*、*slc12a10-like1* であった。*slc4a4a* と *slc9a3* については、淡水環境ですでに岐阜ハリヨにおいて有意に発現量が低い。*slc4a4a* は、ナトリウムと重炭酸イオンの取り込みに関わる輸送体、*slc9a3* はナトリウムと水素イオンの交換輸送体であり、淡水環境におけるイオンの取り込みに重要な働きをする (Hiroi and McCormick 2012 *Respir Physiol Neurobiol*)。岐阜ハリヨは、これらの遺伝子の発現を低く抑えていることが明らかになった。淡水環境に適応するために岐阜ハリヨは、イオン輸送体の発現を低く抑えることによって浸透圧調節に係るコストを低く抑えているのかもしれない (Kitano et al. 2010 *Curr Biol*)。本研究で注目しているのは、*slc12a10-like1* の発現パターンである。これまで知られている *slc12a10* の働きは、淡水環境におけるナトリウムとクロライドの取り込みである (Hiroi et al. 2008 *J Exp Biol*)。海水環境では *slc12a10* 発現は、減少することが知られている。イトヨには、2 種類の *slc12a10* が存在することが分かっており、*slc12a10-like1* と *slc12a10-like2* と命名している。*slc12a10-like2* は、海水環境でその発現が減少したことから、イトヨの *slc12a10-like2* が真骨魚類で知られる Fish Specific NCC (Hiroi et al. 2008 *J Exp Biol*) に該当するものと考えている。イトヨ *slc12a10-like1* の生理機能については、現在解析を進めているところであるが、海水環境で発現が上昇することから、イオンの排出に関わる可能性を考えている。特に、浸透圧調整能が岐阜ハリヨと比較して高い大野イトヨにおける *slc12a10-like1* の発現が、海水環境に移行後に平均 15 倍以上の上昇を示した。それに対して岐阜ハリヨの *slc12a10-like1* の発現は、海水移行後に 5 倍程度の発現上昇に留まっている。カナダに生息する遡河型と淡水型イトヨについて同様の解析をしたところ、大野イトヨと岐阜ハリヨと同様に塩分耐性が強い遡河型集団において *slc12a10-like1* が淡水型集団に比べて有意に高く発現していることも確認した (Kusakabe et al. in prep)。これらの結果から、イトヨの塩分耐性の強度を決める重要な制御機構のひとつとして、鰓に発現する *slc12a10-like1* を海水環境において十分に上昇させる能力があることが考えられる。

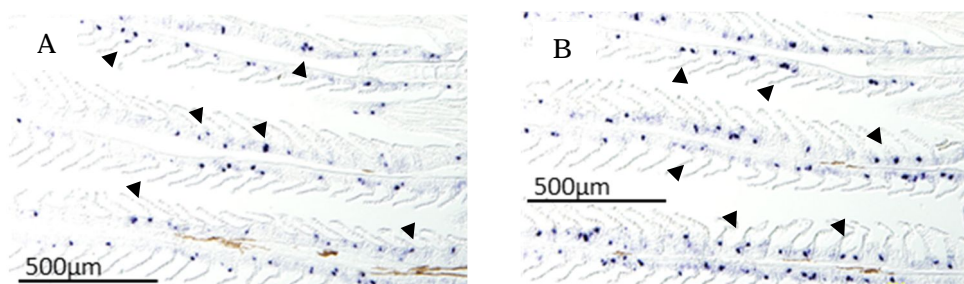


図 2 . In situ hybridization によるイトヨ鰓における *slc12a10-like1* (A)および *slc12a10-like2* (B) の発現部位解析。矢頭は *slc12a10* のシグナルを示す。

Slc12a10 の発現部位を In situ hybridization により解析した結果、*slc12a10-like1* と *slc12a10-like2* は、どちらも鰓の塩類細胞に発現することが分かった (図 2)。しかしながら、*slc12a10-like1* と *slc12a10-like2* の発現部位が同じ種類の塩類細胞であるかは未解明である。*Slc12a10-like1* と *slc12a10-like2* をそれぞれ認識する抗体を作成した。免疫染色法により、*slc12a10-like1* と *slc12a10-like2* を染め分けることを試みているが、発現部位を明確に示す結果を得られていない。今後は、作成した抗体を精製することによって抗体の精度を高めることを計画している。

(2-1) 岐阜ハリヨと大野イトヨの鰓における RNA-seq 解析

実験(1)の海水馴致実験から得られたサンプルを用いて、RNA-seq 解析を実施した。実験(1)では、浸透圧調節に関わる主要なイオン輸送体・チャネル 11 遺伝子と先行研究から得られた浸透圧調節候補因子の 7 遺伝子について、リアルタイム定量 PCR 法を用いて、目的遺伝子を絞り込んで解析を進めた。その結果、岐阜ハリヨと大野イトヨにおいて発現量が異なる浸透圧調節因子が存在することが見えてきた。しかしながら、目的遺伝子を絞り込む手法では浸透圧調節を制御する因子の全体像が見えてこない。そこで、RNA-seq 法を用いて、岐阜ハリヨと大野イトヨの鰓に発現する遺伝子の違いを網羅的に解析した。岐阜ハリヨ淡水群と大野イトヨ淡水群、岐阜ハリヨ 50%海水群と大野イトヨ 50%海水群でそれぞれの実験群の鰓において有意に発現量が異なるイオン輸送体・チャネル関連遺伝子を Log₂FC = 2.0, FDR = 0.05 の条件でリストを作成した (表 2、岐阜ハリヨ淡水群と大野イトヨ淡水群の結果のみを示す)。

RNA-seq の結果を総括すると、浸透圧調節能に違いがある岐阜ハリヨと大野イトヨの鰓において発現量が有意に異なるイオン輸送体・チャネル遺伝子としてリストアップされたものの中に、ナトリウムの輸送に関わる輸送体やチャネル遺伝子は、*slc9a2* と *slc24a5* のみであった。それに対してリストアップされた遺伝子のうち 6 割がカリウムの輸送に関わるものであった。こ

れまでの浸透圧調節の研究では、ナトリウムの輸送に関わる輸送体やチャネルを中心に解析を進めてきた。今後の研究には、カリウムが浸透圧調節のどの側面に重要な役割を果たすかを解明する必要があると考えている。例えば、遡河型と淡水型イトヨを用いて QTL 解析を行った先行研究では、表現型として血中のナトリウム濃度を用いている (Kusakabe et al. 2017 *Mol Ecol*)。本研究の結果を考慮に入れると、表現型として血中のカリウム濃度を使用すると、より正確に集団間の海水・淡水耐性能の差異を生み出す原因遺伝子座を同定することができるかもしれない。

表 2. 岐阜ハリヨ淡水群と大野イトヨ淡水群において、大野イトヨの鰓において有意に発現量が高いイオン輸送体・チャネル関連遺伝子

Gene name or ID	Description
<i>cacna1fb</i>	Calcium channel, voltage-dependent, L type, alpha 1F subunit
<i>clcn2a</i>	Chloride channel, voltage-sensitive 2a
<i>hcn2b</i>	Hyperpolarization activated cyclic nucleotide-gated potassium channel 2b
<i>kcnc3b</i>	Potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 3b
<i>kcng3</i>	Potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 3
<i>kcnv1</i>	Potassium voltage-gated channel modifier subfamily V member 1
LOC120811232	Potassium voltage-gated channel subfamily G member 2-like
LOC120819453	Aquaporin-8-like
LOC120822375	Short transient receptor potential channel 4-like
LOC120823060	Voltage-gated potassium channel subunit beta-2-like
LOC120829077	ATP-sensitive inward rectifier potassium channel 1-like
LOC120835503	Solute carrier family 41 member 1-like
<i>slc24a5</i>	Solute carrier family 24 member 5

(2-2) 50%海水馴致後の岐阜ハリヨと大野イトヨの鰓における ATAC-seq 解析

実験(2)および上記の RNA-seq 解析により、岐阜ハリヨと大野イトヨの鰓において有意に発現量が異なる遺伝子が複数明らかになった。それらの発現がエピジェネティック制御により調節されている可能性について、ATAC-seq 法を用いて解析を進めた。岐阜ハリヨと大野イトヨの鰓において有意に発現量が異なる遺伝子についてそれぞれオープンクロマチン領域の分布を解析したが、岐阜ハリヨと大野イトヨにおいて明確に違いが認められた遺伝子はなかった。現状では、RNA-seq から得られた結果を ATAC-seq の結果と融合して解析する方法を構築できていない。しかしながら、鰓に発現する全遺伝子について網羅的に解析をすると、岐阜ハリヨと大野イトヨでは明確にオープンクロマチン領域の分布様式が異なっていることが認められた(図3)。本研究から、岐阜ハリヨと大野イトヨ間の鰓における遺伝子発現動態に何らかのエピジェネティック制御が関わっていることが示唆されるデータが得られた。今後は、具体的にそれがどのような生理機構に関わる遺伝子なのかについて解析を進めていきたい。

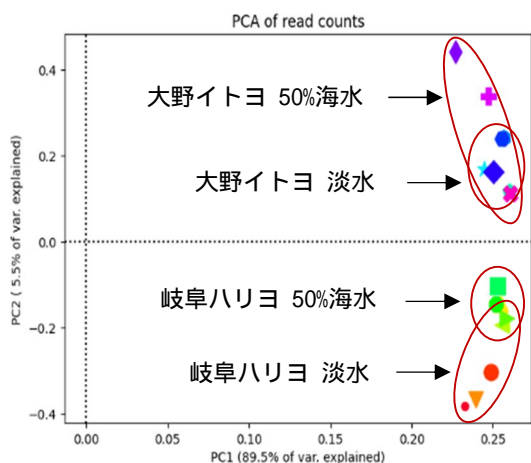


図 3. 岐阜ハリヨと大野イトヨの鰓におけるオープンクロマチン領域分布の違い (主成分分析)

本研究により、岐阜ハリヨと大野イトヨという集団間における浸透圧調節の違いを生み出す因子の一端が明らかになった。特にカリウムの輸送制御が浸透圧調節の多様化を理解する上で重要である可能性が見出されたことは、次の研究に発展させる重要な発見だった。今後は、本研究で得られた結果を岐阜ハリヨと大野イトヨ以外のイトヨ集団あるいは異なる魚種に展開することによって、真骨魚類の浸透圧調節の多様化のメカニズムの解明につなげたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Kitano J, Kakioka R, Ishikawa A, Toyoda A, Kusakabe M.	4. 巻 33
2. 論文標題 Differences in the contributions of sex linkage and androgen regulation to sex-biased gene expression in juvenile and adult sticklebacks.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Evolutionary Biology	6. 最初と最後の頁 1129-1138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jeb.13662	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤春香、日下部誠
2. 発表標題 海水移行にともなうハリヨの腸におけるイオン輸送体・チャネル遺伝子の発現変化
3. 学会等名 2022年度日本動物学会中部支部大会信州大学
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺崎 渚、北野 潤、森 誠一、日下部 誠
2. 発表標題 陸封型イトヨにおける浸透圧調節能の違い
3. 学会等名 令和3年度日本動物学会中部支部大会富山大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 日下部 誠、水谷 麻希、石原顕紀
2. 発表標題 ウシガエル幼生の浸透圧調節機構
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 鈴木義己、神部飛雄、北野潤、日下部誠
2. 発表標題 イトヨにおける仔稚魚期の甲状腺形成メカニズムの解析
3. 学会等名 2023年度日本動物学会中部支部大会三重大学
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
研究協力者	北野 潤 (Kitano Jun)		

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