

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06757

研究課題名(和文)新奇細胞種の発生を制御する進化遺伝基盤の解明

研究課題名(英文) Evolutionary genetic basis of developmental regulation of a novel cell type

研究代表者

橋本 寿史 (Hashimoto, Hisashi)

名古屋大学・理学研究科・助教

研究者番号：30359757

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)：脊椎動物の多くは皮膚に黒、虹、黄色の3種類の色素細胞を持つが、一部の真骨魚類はそれに加えて白色の色素細胞(白色素胞)を持つ。これは真骨魚類の進化の過程で新しい種類の細胞が誕生したことを意味する。本研究では、白色素胞を持つメダカをモデルとして、白色素胞の進化的獲得を可能にした遺伝子の同定を目指した。4種類の色素細胞についてそれぞれRNA-seq解析を行なうことで、各細胞に特異的に発現する遺伝子群を網羅的に同定することができた。白色素胞特異的遺伝子の中には、幹細胞の分化制御を担うことが知られる転写因子が含まれていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物は多様な体色を持つが、それには皮膚の色素細胞の存在が不可欠である。脊椎動物の祖先はおそらく元々黒い色素細胞しか持たなかったが、進化の過程で虹色や黄色、白色などの細胞を発見し、色素細胞の多様性、さらに体色の多様性が生まれるに至った。このような細胞多様性は、発生学的に同系列内で細胞の種類が増えることで生まれる。例えば、血液細胞の系列内で免疫細胞が多様化したのと同様である。発生において幹細胞からいろいろな種類の細胞を作り出すには細胞を特徴付ける「分化」を誘導する必要があるが、その鍵となる働きをする細胞種特異的転写因子を同定することは細胞多様性の理解につながる。

研究成果の概要(英文)：Most vertebrates have three types of pigment cells in their skin: black melanophore, silvery iridophore, and yellow xanthophore, but some teleosts have white pigment cells (leucophores) in addition. This means that a new type of cell was created during the evolution of bony fishes.

In this study, we aimed to identify the genes that enabled the evolutionary acquisition of a new cell type, using the medaka fish, which has leucophores, as a model.

By performing RNA-seq analysis on each of the four types of pigment cells, we were able to comprehensively identify a set of genes specifically expressed in each cell. Among the leucophore-specific genes were transcription factors known to regulate stem cell differentiation.

研究分野：発生生物学

キーワード：色素細胞 転写因子 白色素胞 真骨魚類 進化的新奇性

1. 研究開始当初の背景

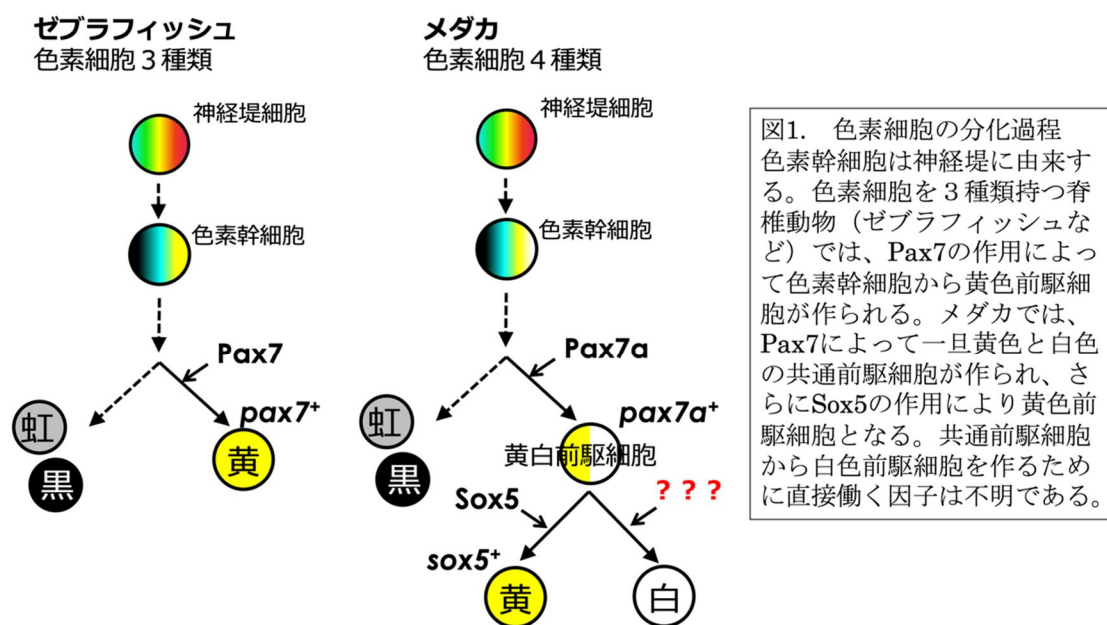
多細胞生物は、からだを構成する細胞の種類を増やすことで、個体としての構造や機能を複雑かつ多様化する進化を遂げてきた。進化の過程では祖先生物に見られない新しい細胞種が現れることがある。これを新奇細胞種とよぶが、新奇細胞種が創出される進化的・発生学的なメカニズムはよく分かっていない。

動物の体色は環境適応や視覚コミュニケーションの手段として重要な役割を果たす。色素細胞は動物の体色を作る主要な要素であり、さまざまな脊椎動物において、その多様性は種固有の体色や紋様を作るために不可欠である。

脊椎動物の多くは、黒色素胞、黄色素胞、虹色素胞の3種類の色素細胞を持つが、一部の真骨魚類には、それに加え、白色の色素細胞(白色素胞)が存在する。白色素胞が加わることで、例えばメダカの背地適応において、より高度な体色の明暗化が可能になる。

これまでの研究で、メダカにおいて白色素胞は黄色素胞の系譜から分岐して発生することが明らかになっている(図1)。この分岐には転写因子 Sox5 が関与するが、Sox5 は、細胞自律的に黄色素胞の分化を促進することから、白色素胞の進化的獲得に直接貢献したとは考えられない。

では、白色素胞獲得の直接の分子的要因は何だったのだろうか? それは発生において白色素胞に発現してその分化を直接(細胞自律的に)制御する遺伝子であるに違いない。なぜなら、新奇細胞種の進化的獲得は、既存の細胞系譜から別の新しい系譜を積極的に分岐させる能力が遺伝的に備わってこそ成立するからである。



2. 研究の目的

本研究の目的は、メダカの白色素胞をモデルとして、新奇細胞種の進化的獲得をもたらす分子基盤を解明することである。その第一歩として、色素細胞種の間で比較発現解析を行うことによって、白色素胞特異的に発現する遺伝子を探索した。

3. 研究の方法

(1) セルソーターを用いた前駆細胞の分画とRNA-seq解析

白色素胞が黄色素胞と共通の前駆細胞から発生することに着目し(図1)前駆細胞が遺伝的に蛍光ラベルされるメダカを作成した(Watakabe et al., 2018)。トランスジェニックメダカ Tg(pax7a-GFP)と Tg(sox5-GFP)では、白色素胞と黄色素胞の両方に分化する前駆細胞(pax7a発現細胞)と、黄色素胞にだけ分化する前駆細胞(sox5発現細胞)がそれぞれGFPでラベルされる。Tg(pax7a-GFP)の遺伝的背景をsox5ホモ変異体にしたメダカでは、黄色素胞が発生しな

いため、白色素胞の前駆細胞だけが蛍光ラベルされる。

各系統の胚を用いて、フローサイトメトリー法により、白色素胞と黄色素胞の前駆細胞、黄色素胞の前駆細胞、白色素胞の前駆細胞をそれぞれ分画収集した。各画分から精製した RNA を材料として、RamDA 法により RNA-seq 解析を行なった。

(2) マニュアルピックアップによる色素細胞の分取と RNA-seq 解析

(1) とは別に、分化した色素細胞全種（黒、虹、黄、白）について、成体の皮膚細胞懸濁液から自然着色を目安に顕微鏡下で 50~100 細胞をそれぞれ収集した。各細胞ライセートを直接逆転写反応した後、PCR で増幅し、RNA-seq 解析を行なった。

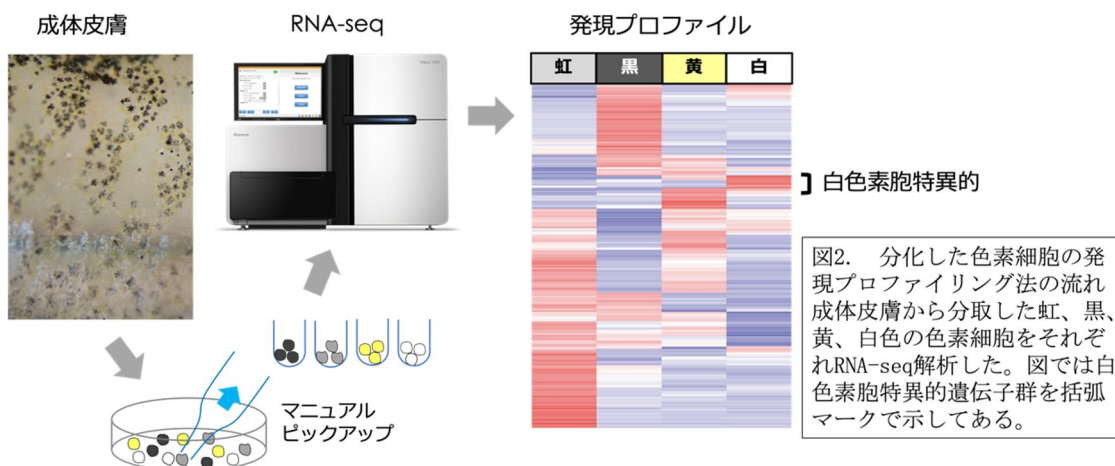
4. 研究成果

(1) 蛍光陽性前駆細胞の発現解析

蛍光ラベルのために用いた遺伝子 *pax7a* および *sox5* はいずれも、色素細胞だけでなく神経細胞にも発現していたため、緑色蛍光陽性細胞画分には神経細胞が混入すると考えられた。不要な神経細胞画分を除去する目的で、神経細胞が赤色蛍光を発する *Tg(elav-DsRed)* メダカを上記の緑色蛍光メダカに交配して、色素細胞が緑色、神経細胞が緑色と赤色の蛍光を持つメダカを作製した。これを用いて、緑色蛍光を持ち赤色蛍光を持たない細胞画分をセルソーターで単離した。RNA-seq 解析による発現プロファイリングの結果、この実験系で単離した前駆細胞画分には、除去しきれなかった神経細胞が混入しており、色素細胞の発現遺伝子を正確に反映したデータが取れていないことが分かった。

(2) 分化した色素細胞の発現解析

分化（着色）後の成体色素細胞を用いた RNA-seq 解析により、各色素細胞種に特異的に発現する遺伝子群を同定することができた（図 2）。例えば、白色素胞の白発色は尿酸の蓄積によるが（Goda et al., 2023, under revision）今回の結果から、尿酸の合成を担うグアニンデアミナーゼ遺伝子が白色素胞特異的に発現することが分かった。また白色素胞特異的遺伝子の中には他にも、他の色素細胞の 40~70 倍以上の発現量を示す有望な転写因子が含まれていた。今回行なった RNA-seq の結果は、色素細胞種ごとに特異的な既知遺伝子の発現を反映していたことから、信頼性が高いと考えられる。



(3) まとめ

本研究は、胚性色素前駆細胞の網羅的発現解析を目指してスタートしたが、胚性の色素前駆細胞は細胞の絶対数が少ない上、分画に必要な特異的マーカーがないため、純度の高い細胞試料を準備することが困難だった。一方、分化し着色した成体色素細胞は、色で細胞種が判定できるため、確実に特定の細胞種を収集できた。しかしながら、マニュアルの作業にともなう限界から、収集可能な細胞数は限られる。それを補うため、今回の解析では、cDNA を PCR 増幅したが、それでも遺伝子発現の細胞種特異性は担保されていた。

先行研究では、自然色を利用してゼブラフィッシュの色素細胞をセルソーターで分画することに成功した例がある（Higdon et al., 2013）。しかし、この研究では、蛍光フローサイトメトリー法を応用した方法を使っており、黒色素胞と虹色素胞は分画できているが、黄色素胞の単離は実現できていない。本研究で行なった RNA-seq 解析は、全ての色素細胞の間で遺伝子発現を比較した初めての例である。原理的に極めて簡易な細胞収集によることから、さまざまな動物種の色素細胞研究に応用可能である。

今後、今回同定できた白色素胞特異的転写因子の機能解析を進めることにより、メダカにおいて新奇細胞種である白色素胞の獲得に至った分子基盤の解明にせまることができると期待される。

引用文献

Watakabe I, Hashimoto H, Kimura Y, Yokoi S, Naruse K, Higashijima S. Highly efficient generation of knock-in transgenic medaka by CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Zoological Letters* 4, 3 (2018).

Goda M, Miyagi A, Kitamoto T, Kondo M, Hashimoto H. Uric acid is a major chemical constituent for the whitish coloration in the medaka leucophores. *Pigment Cell & Melanoma Research under revision* (2023).

Higdon CW, Mitra RD, Johnson SL. Gene expression analysis of zebrafish melanocytes, iridophores, and retinal pigmented epithelium reveals indicators of biological function and developmental origin. *PLoS ONE* 8(7), e67801 (2013).

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 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tsunogai Yuri, Miyadai Motohiro, Nagao Yusuke, Sugiwaka Keisuke, Kelsh Robert N., Hibi Masahiko, Hashimoto Hisashi	4. 巻 63
2. 論文標題 Contribution of sox9b to pigment cell formation in medaka fish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Development, Growth & Differentiation	6. 最初と最後の頁 516 ~ 522
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/dgd.12760	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 Hamied Atyaf, Alnedawy Qusay, Correia Ana, Hacker Christian, Ramsdale Mark, Hashimoto Hisashi, Kudoh Tetsuhiro	4. 巻 23
2. 論文標題 Identification and Characterization of Highly Fluorescent Pigment Cells in Embryos of the Arabian Killifish (Aphanius Dispar)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 101674 ~ 101674
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2020.101674	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 Watanabe Yuko, Okuya Kazuho, Takada Yuki, Kinoshita Masato, Yokoi Saori, Chisada Shinichi, Kamei Yasuhiro, Tatsukawa Hideki, Yamamoto Naoyuki, Abe Hideki, Hashimoto Hisashi, Hitomi Kiyotaka	4. 巻 168
2. 論文標題 Gene disruption of medaka (<i>Oryzias latipes</i>) orthologue for mammalian tissue-type transglutaminase (TG2) causes movement retardation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 213 ~ 222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa038	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kobayashi H, Ansai S, Omori Y, Goda M, Naruse K, Hibi M, Hashimoto H
2. 発表標題 Miyuki medaka as a model for studying iridophore migration and proliferation.
3. 学会等名 第28回小型魚類研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本寿史、白石陽子、杉若佳祐、小林輝、木村哲晃、安齋 賢、田中理映子、山平寿智、Kawilarang WA Mesengi、宮台元裕、長尾勇佑、Kelsh RN、成瀬 清、日比正彦
2. 発表標題 魚類の黄色素胞発生を支える転写制御ネットワーク
3. 学会等名 第93回日本動物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Sugiwaka K, Kobayashi H, Kimura T, Ansai S, Tanaka R, Yamahira K, Masengi KWA, Miyadai M, Nagao Y, Kelsh RN, Naruse K, Hibi M, Hashimoto H
2. 発表標題 The MiT/TFE family members of transcription factors, Mitfa, Mitfb and Tfec, play an important role in pigment cell development in medaka.
3. 学会等名 第55回日本発生生物学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Goda Makoto, Wakamatsu Yuko, Kobayashi Kenichi, Inoue Chikako, Villareal Myra, Isoda, Hiroko, Ohtani Katsumi, Nishimaki Toshiyuki, Oota Hiroki, Ogawa Motoyuki, Kimura Tetsuaki, Naruse Kiyoshi, Kelsh Robert N, Hibi Masahiko, Hashimoto Hisashi
2. 発表標題 Hypothetical mechanism for variegated body pigmentation: epigenetic alteration of local PKA activity.
3. 学会等名 第54回日本発生生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Goda M, Wakamatsu Y, Kobayashi K, Inoue C, Villareal M, Isoda, H, Ohtani K, Nishimaki T, Oota H, Ogawa M, Kimura T, Naruse K, Kelsh RN, Hibi M, Hashimoto H.
2. 発表標題 Hypothesis for variegated body pigmentation based on aberrant regulation of PKA activity.
3. 学会等名 第26回小型魚類研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hashimoto H, Watakabe I, Miyadai M, Takada H, Kimura T, Naruse K, Higashijima S, Hibi M.
2. 発表標題 Pax3b and Pax7a have sequential function to regulate fate choice of pigment cells in medaka.
3. 学会等名 第53 回日本発生生物学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsunogai Y, Hibi M, Hashimoto H.
2. 発表標題 Roles of Sox9b in medaka pigment cell development.
3. 学会等名 第53 回日本発生生物学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Hisashi Hashimoto, Makoto Goda, Robert N Kelsh	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 38
3. 書名 Pigments, Pigment Cells and Pigment Patterns	

1. 著者名 平田 普三	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 148
3. 書名 ゼブラフィッシュ実験ガイド	

〔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 分 担 者	宇治 督 (Uji Susumu) (40372049)	国立研究開発法人水産研究・教育機構・水産技術研究所(南勢)・主任研究員 (82708)	
研究 分 担 者	成瀬 清 (Naruse Kiyoshi) (50208089)	基礎生物学研究所・IBBPセンター・特任教授 (63904)	

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