

令和 6 年 5 月 29 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14919

研究課題名(和文)フナ類におけるクローン繁殖の分子基盤の解明からその応用まで

研究課題名(英文)Molecular basis of clonal reproduction in Carassius fish and its application for engineering clonal animals.

研究代表者

三品 達平(Mishina, Tappei)

九州大学・農学研究院・助教

研究者番号：40830162

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：自然界でクローン繁殖をすることが知られるフナ属魚類をモデルとして、「クローン繁殖の安定性」と「クローン繁殖の分子基盤」を、詳細な細胞学的な観察と集団ゲノム解析、遺伝子操作実験を統合するアプローチで解析した。細胞学的な観察からは、クローン繁殖がきわめて安定した一貫性のある形質であることを示唆するデータを得た。そのような形質の原因となる分子基盤を集団ゲノム解析・遺伝子発現解析から絞り込み候補遺伝子を得た。また、これら候補遺伝子について、ゼブラフィッシュを用いて遺伝子編集によるノックアウト、卵母細胞での人為的な遺伝子発現実験を実施し解析したところ、クローン繁殖の表現型を部分的に再現できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

クローン繁殖をする生物の作出は、生命科学や農林水産分野に革新をもたらすと期待される。このクローン繁殖化を動物で実現するには「減数分裂と受精の機構を解明し、適切に遺伝子改変すること」が重要であるが、こうした試みは動物では皆無であった。本研究では、フナ類のゲノム解析等から特定したクローン繁殖の原因候補遺伝子によって、部分的にクローン繁殖の形質を他の魚で再現できた。こうした遺伝子を適切に制御することにより、クローン繁殖動物の作出に加え、ヒトの染色体異常による疾患や不妊に対する基礎医学へと応用できる可能性が見出された。

研究成果の概要(英文)：Using crucian carp fishes, which are known to reproduce clonally in nature, as a model, we analyzed the "stability of clonal reproduction" and the "molecular basis of clonal reproduction" using an approach that integrates detailed cytological observations, population genome analysis, gene expression analysis, and genetic manipulation experiments. Cytological observations showed that clonal reproduction is a highly stable and consistent trait. Then, the molecular basis for such traits was explored using population genome analysis and gene expression analysis, and candidate genes were obtained. We also analyzed these candidate genes by gene editing (knockout) and artificial gene expression experiments in oocytes, and were able to reproduce the part of the phenotype of clonal reproduction.

研究分野：水圏生命科学

キーワード：フナ クローン繁殖 遺伝基盤 減数分裂 受精卵 染色体分配 遺伝子操作

1. 研究開始当初の背景

動植物において、同一種内あるいは異種間のある特定の両親間の交雑により得られた雑種個体が両親よりも優れた形質を示す現象(雑種強勢)は、農林水産分野において広く応用されてきた。一方で、雑種個体作出のための純系の維持費や雑種個体の購入費は事業者の大きな負担となっている。そこで、雑種強勢などで生じた有用形質を固定・永続化するためのアプローチとして、クローン繁殖をする生物を作出することが近年試みられてきている。クローン繁殖をする生物を作出する鍵となるのが、「クローンの減数分裂を経ない配偶子の産出」と「受精した雄由来のゲノムが排除される」という二つの機構がどのような分子基盤に基づくか、を解明することである。植物ではシロイヌナズナに端を発した研究は、コメに応用されるなど成果を挙げているが、動物では関連する遺伝子の候補や変異体がいまだ見いだせておらず、ほとんど進んでいない。

コイ科フナ属魚類は、こうしたクローン繁殖の分子基盤を追究するための良いモデルである。フナ類には、自然界で有性型の2倍体(2n)と基本的に雌のみからなるクローン型の3倍体(3n)が様々な環境の水域で共存することが知られる。この3nフナにおけるクローン繁殖には、①組換えの欠如に加え、②第一減数分裂過程の改変による非還元卵の産出、および③受精後の雄核の脱核が重要と考えられている。一般的に、クローン繁殖をする脊椎動物では組換えがないため、遺伝学による責任遺伝子の探索は不可能である。フナ類はその唯一の例外であり、クローン型3nが稀な有性生殖を介して有性型2nと遺伝的交流をもつことで「有性型」と「クローン型」が野外で多型的に維持されていることから、集団ゲノム解析を用いて、「有性型」および「クローン型」を説明できるような変異を同定しうる。そして、こうした変異の機能を理解し、制御・再現できれば、クローン繁殖をする動物の作出の可能性が拓かれると期待される。

2. 研究の目的

本研究では、フナ属魚類に見られるクローン繁殖をモデルとして、クローン繁殖が可能となった背景にある減数分裂や受精後の核構造制御といった基本的な生命現象の分子機構・機能を解明する。そして、その知見に基づいて適切な遺伝子操作をすることで、クローン繁殖が可能となる脊椎動物を作出するまでの枠組みを構築することを当初の目的とした。この目的を達成するために、次の3項目を柱として研究を進めることとした。(1)クローン繁殖形質の安定性評価、(2)クローン繁殖の責任遺伝子が減数分裂や核構造制御に果たす分子機構の解明、(3)遺伝子操作によるクローン繁殖形質の再現。

3. 研究の方法

クローン繁殖をする動物の作出に重要なステップである「形質の安定性」「分子基盤の同定」「クローン繁殖形質の再現」について、以下の方法で研究を進めることを計画した。

(1) クローン繁殖形質の安定性評価

フナ類におけるクローン繁殖の再現が、高効率のクローン繁殖動物の作出につながりうるのか調べるために、その形質の安定性を評価した。フナ類では、組換えの欠如に加え、第一減数分裂過程の改変(第一極体が放出されない)による減数分裂を経ない卵(非還元卵)の産出と、受精後の雄核の脱凝縮不全の結果としての雄核の排除が重要と考えられている。そこで、細胞学的な観察から、①組換えの欠如の割合、②第一減数分裂における極体放出率、③雄核の脱凝縮率、を定量した。

①組換え欠如の割合

有性型およびクローン型のフナからGV期の卵母細胞を回収し、培養下で最終成熟を誘導した。そして、核膜崩壊直後の核を単離、固定・染色することによって組換えによる交叉が見られる染色体の数を調べた。

②第一極体の放出率

有性型およびクローン型の排卵した未受精卵を固定、免疫染色を行い、共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察することで、第一極体が観察される割合を定量した。

③雄核の脱凝縮率

有性型およびクローン型のフナについて人工授精を行った後に固定し、免疫染色を行った。試料を共焦点レーザー蛍光顕微鏡で観察することで、核の大きさを定量した。

さらに、ゲノムワイドに取得した多型情報を用いて親(クローン型フナ)と子の遺伝子型の一

致率を調べ、細胞学的な観察と一貫性のある結果が得られるかを検証した。

(2) クローン繁殖の責任遺伝子が減数分裂や核構造制御に果たす分子基盤の解明
これまでに有性型およびクローン型のフナについて全ゲノムリシーケンシングを行い、有性・クローンの両形質について全ゲノム関連解析を行ってきた。さらに、卵母細胞を中心に複数の組織について RNA-seq による網羅的トランスクリプトーム解析を行い、卵母細胞で発現している候補遺伝子と、有性型・クローン型の間で発現量変動が見られる遺伝子を絞り込んだ。

(3) 遺伝子操作によるクローン繁殖形質の再現
ゼブラフィッシュを用いて、候補遺伝子の遺伝子編集によるノックアウト、卵母細胞における人為的な遺伝子発現（有性型とクローン型をそれぞれ発現）を行うことで、クローン繁殖の各形質「組換えの欠如」、「第一減数分裂における極体放出不全」、「受精後の雄核凝縮不全」が生じるかを定量した。

4. 研究成果

(1) クローン繁殖形質の安定性評価
細胞学的な観察から、クローン型では、分析したすべての卵で組換えが欠如していること、第一極体が放出されないことが明らかとなった。一方で、雄核の脱凝縮不全については、一部の受精卵で脱凝縮が認められた。
この結果は、親子間の遺伝子解析でも裏付けられ、母親側の遺伝子型に組換えや極体放出の痕跡は認められないものの、およそ 5%の子で雄親の遺伝的貢献が認められた。こうした雄親が遺伝的に貢献した場合の子は 4 倍体となることが明らかになった。以上の結果は、フナ類におけるクローン繁殖は安定した形質であることを示唆する。

(2) クローン繁殖の責任遺伝子が減数分裂や核構造制御に果たす分子基盤の解明
有性型とクローン型をほぼ完全に説明するゲノム領域が特定された。さらに、遺伝子発現解析から卵母細胞で発現する遺伝子を絞り込んだところ、有望な候補遺伝子を絞り込むことができた。これらには、組換えの基となる二本差 DNA 切断、細胞分裂における紡錘体形成・細胞周期の制御、核構造制御に関わる遺伝子が含まれる。さらに、これらの遺伝子の多くは挿入・欠失などの構造変異を含むこと、クローン型フナは、有性型とクローン型のみに見られるアレルがヘテロの状態にあることが明らかになった。これらの結果は、クローン型のみに見られるアレルが顕性あるいは相加的な効果をもち、こうしたアレルの発現によって、クローン繁殖の形質が表出するものと示唆された。したがって、これらアレルを人為的に発現させることで、クローン繁殖の形質を再現できる可能性がある。

(3) 遺伝子操作によるクローン繁殖形質の再現
得られた候補遺伝子が多かったために、時間的制約から①組換えの欠如、および②第一極体が放出しない、の二形質に焦点を当てて遺伝子操作実験による再現を目指した。核構造制御については、引き続き詳細な解析を続けていく。

①組換えの欠如の再現
哺乳類において組換えの基となる二本差 DNA 切断を引き起こすことが知られる、ある遺伝子について、ゼブラフィッシュを対象に遺伝子編集でノックアウトした。その結果、この変異体の雌個体は、成熟卵をつくる能力はもつが、組換えが欠如しているために、減数分裂において染色体が正しく分配されないことが明らかとなった。

②第一極体放出不全の再現
細胞分裂における紡錘体形成・細胞周期の制御などに関わる遺伝子群を含む候補遺伝子について、有性型およびクローン型のアレルの人工 mRNA を合成した。そして、ゼブラフィッシュの卵母細胞に、合成した人工 mRNA をマイクロインジェクションし、培養下で最終成熟を誘導した。そして、第一極体の放出率に、有性型アレルとクローン型アレルを人為的に発現させた条件間で違いが見られるかを検証した。その結果、クローン型アレルを人為的に発現させた場合、有性型アレルを発現させた場合に比べて有意に極体放出率が低下した。

まとめ
本研究では、フナ類のゲノム解析等から特定したクローン繁殖の原因候補遺伝子によって、部分的にクローン繁殖の形質を他の魚で再現できた。こうした遺伝子を適切に制御することにより、クローン繁殖動物の作出に加え、ヒトの染色体異常による疾患や不妊に対する基礎医学へと応用できる可能性が見出された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Mishina Tappei, Nomoto Kazuhiro, Machida Yoshiyasu, Hariu Tsutomu, Watanabe Katsutoshi	4. 巻 17
2. 論文標題 Origin of scarlet gynogenetic triploid Carassius fish: Implications for conservation of the sexual-gynogenetic complex	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0276390
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0276390	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 Naito Takuya, Nakayama Kouji, Takeshima Hirohiko, Hashiguchi Yasuyuki, Akita Tetsuya, Yamasaki Yo Y., Mishina Tappei, Takeshita Naohiko, Nagano Atsushi J., Takahashi Hiroshi	4. 巻 in press
2. 論文標題 The detailed population genetic structure of the rare endangered latid fish akame Lates japonicus with extremely low genetic diversity revealed from single-nucleotide polymorphisms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Conservation Genetics	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10592-023-01517-2	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 三品達平・山崎曜	4. 巻 69
2. 論文標題 2022年度魚類学会年会シンポジウム「ゲノムが拓く魚類表現型多様性研究の新展開：分野横断的自然史研究と今後の展望」を開催して	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 魚類学雑誌	6. 最初と最後の頁 252 ~ 257
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 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 Kokita Tomoyuki, Ueno Kohtaro, Yamasaki Yo Y., Matsuda Masanari, Tabata Ryoichi, Nagano Atsushi J., Mishina Tappei, Watanabe Katsutoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Gudgeon fish with and without genetically determined countershading coexist in heterogeneous littoral environments of an ancient lake	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ecology and Evolution	6. 最初と最後の頁 13283 ~ 13294
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/ece3.8050	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 Mishina Tappei, Tabata Namine, Hayashi Tetsutaro, Yoshimura Mika, Umeda Mana, Mori Masashi, Ikawa Yayoi, Hamada Hiroshi, Nikaido Itoshi, Kitajima Tomoya S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Single oocyte transcriptome analysis reveals aging associated effects influenced by life stage and calorie restriction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aging Cell	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/accel.13428	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 Mori Masashi, Yao Tatsuma, Mishina Tappei, Endoh Hiromi, Tanaka Masahito, Yonezawa Nao, Shimamoto Yuta, Yonemura Shigenobu, Yamagata Kazuo, Kitajima Tomoya S., Ikawa Masahito	4. 巻 220
2. 論文標題 RanGTP and the actin cytoskeleton keep paternal and maternal chromosomes apart during fertilization	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Cell Biology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1083/jcb.202012001	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 Mishina Tappei, Takeshima Hirohiko, Takada Mikumi, Iguchi Kei ' ichiro, Zhang Chunguang, Zhao Yahui, Kawahara-Miki Ryouka, Hashiguchi Yasuyuki, Tabata Ryoichi, Sasaki Takeshi, Nishida Mutsumi, Watanabe Katsutoshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Interploidy gene flow involving the sexual-asexual cycle facilitates the diversification of gynogenetic triploid Carassius fish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-01754-w	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 Mishina Tappei, Chiu Ming-Chung, Hashiguchi Yasuyuki, Oishi Sayumi, Sasaki Atsunari, Okada Ryuichi, Uchiyama Hironobu, Sasaki Takeshi, Sakura Midori, Takeshima Hirohiko, Sato Takuya	4. 巻 33
2. 論文標題 Massive horizontal gene transfer and the evolution of nematomorph-driven behavioral manipulation of mantids	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Current Biology	6. 最初と最後の頁 4988 ~ 4994.e5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cub.2023.09.052	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 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 三品達平
2. 発表標題 フナ属魚類における雌性発生の遺伝基盤から見た性の進化的制約
3. 学会等名 日本魚類学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三品達平
2. 発表標題 フナ属魚類におけるクローン繁殖の遺伝基盤から見た性の進化的制約
3. 学会等名 有性生殖研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三品達平
2. 発表標題 フナ類にみられる倍数性変化を伴うクローン繁殖の分子基盤とその安定性
3. 学会等名 日本生態学会（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

クローン繁殖フナは稀に有性生殖をしながら繁殖 - 遺伝的に多様なクローンフナが存在する謎を解明 - https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2021-11-19-0
天然記念物ヒブナの起源を解明 クローン繁殖のはずなのにキンギョと交雑 https://www.kyoto-u.ac.jp/ja/research-news/2022-10-21

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