

平成30年5月21日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07571

研究課題名(和文) 変態期ヒラメで左右非対称に発現する遺伝子群の単離と甲状腺ホルモン制御機構の解明

研究課題名(英文) Isolation of genes expressed asymmetrically in flounder metamorphosis and regulation by thyroid hormone

研究代表者

横井 勇人 (Yokoi, Hayato)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：40569729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒラメ・カレイ類は変態期に眼の移動と左右非対称な色素胞分化により劇的に体制を変化させる。本研究では、次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現プロファイル解析により、変態初期の眼上棒状軟骨周辺の微細組織サンプルと、変態後期着底後仔魚の皮膚および筋肉サンプルの2サンプルについて、有眼側と無眼側で発現強度が異なる遺伝子を網羅的に単離した。RT-PCRおよびin situ hybridizationにより、右側特異的な眼上棒状軟骨の退縮に関与する可能性がある遺伝子と、有眼側特異的な色素胞分化に関与する可能性がある遺伝子を解析した。

研究成果の概要(英文)：Flounder transform their body plan during metamorphosis; right eye migrates to the other side and pigment cells differentiate only in the ocular side. Gene expression profile were compared between ocular and blind side in tissues around supra orbital bar at early metamorphic stage and skin and muscle tissue at later metamorphic stage in order to isolate genes expressed asymmetrically between ocular and blind side. Candidate genes were further analyzed by in situ hybridization and suggested that genes might be involved in right side specific degeneration of supra orbital bar and genes that genes might be involved in ocular side specific pigment cell differentiation.

研究分野：マリンゲノミクス

キーワード：ヒラメ 変態 異体類 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

ヒラメやカレイなど異体類は、まず左右対称な仔魚として発生したのち、変態期に左右非対称な体制に移行する。変態期には、ヒラメでは右眼が左側に移動し、有眼側のみで色素胞が分化する。異体類の変態は甲状腺ホルモンを中心とした内分泌シグナルによって制御されているが、変態期のダイナミックな形態形成運動が制御されるメカニズムはよく分かっていない。ヒラメやマツカワなど、異体類には水産上重要な魚種が含まれ、増養殖の対象となっているが人工飼育下では変態異常や体色異常が発生して問題となっている。変態の分子基盤を明らかにすることは、基礎生物学的に興味深いだけでなく、水産増養殖の高効率化につながる可能性が期待される。

2. 研究の目的

このような背景のもと、異常発生のメカニズムを解明し、異常発生の低減策の開発に結びつけるために、変態の分子メカニズムを理解することが重要であると考えられた。変態のトリガーとして知られる甲状腺ホルモンは、体内を循環する内分泌シグナルであり、それ自体に左右差はない。結果として左右非対称な形態形成運動が起こるシステムを解明するために、左右で発現が異なる遺伝子の単離を試みた。これまでに、ハイブリダイゼーションに基づいて発現の異なる遺伝子を単離するサプレッションサブトラクション法を用いて発現が異なる遺伝子の単離を試みたが偽陽性が多く、有効なアプローチではなかった。

技術革新により、遺伝子発現プロファイルを網羅的に比較することが可能になったため、ヒラメを用いて、有眼側と無眼側で発現強度の異なる遺伝子の単離を試みた。バイオインフォマティクスに基づく、いわゆるドライデータであるが、RT-PCR や *in situ hybridization* などウェットな実験によって検証し、有眼側と無眼側で発現が異なる遺伝子を網羅的に単離した。

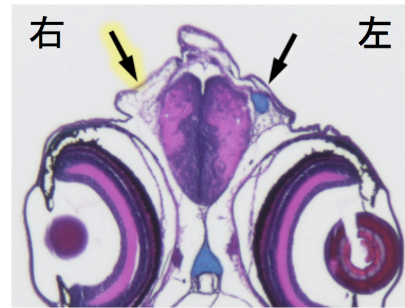
3. 研究の方法

次世代シーケンサーによる遺伝子発現プロファイルの解析には、以下の2サンプルを使用した。1) 変態初期の頭部微細組織、眼上棒状軟骨周辺の右側と左側、2) 変態後期、着底後で体色の左右差が見られるステージの皮膚および筋肉組織の有眼側と無眼側。次世代シーケンス解析によって得られたドライデータは、RT-PCR および *in situ hybridization* などのウェットな実験により検証した。de novo assemble により得られたコンティグ配列をもとにプライマーを設計した。RNA-seq 解析に使用した RNA から作成した cDNA を鋳型として RT-PCR により候補遺伝子をクローニングし、DIG 標識 RNA を作成して *in situ hybridization* のプ

ロープとした。RNA-seq 解析に使用したステージのヒラメサンプルをブアン固定し、パラフィン包埋して 8 μm の切片を作成した。in situ hybridization でシグナルが検出できなかった遺伝子については、より高感度な RT-PCR により発現の左右差を検討した。

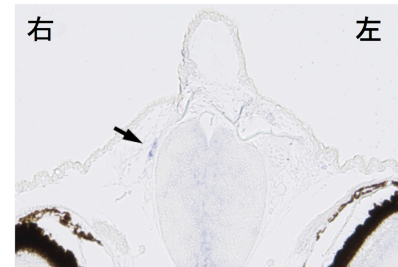
4. 研究成果

(1) 先述のサンプル1について、左右差が見られたのは全て、右側で発現が強い遺伝子だった。この組織では、いったん左右対称に形成された眼上棒状軟骨が右側のみで退縮する。今回の結果は、右側特異的な退縮を実現する分子との関連が想像された。



軟骨染色

左右差が見られたトップ4の遺伝子についてクローニングし、in situ hybridization により検証したが、右側特異的な発現が検出できたのは1遺伝子のみであった。



RT-PCR により検討したところ、調べた4遺伝子すべてについて、右側で強い発現が確認された。

左右差	眼上棒状軟骨		左右
	左	右	
13.618	0.539	7.491	
4.599	2.673	12.531	
4.386	3.926	17.541	
3.794	9.446	36.505	

これらについては、さらに詳細に機能解析をするため、実験モデル魚類を用いた解析に着手した。オーソログを単離し、whole-mount in situ hybridization により発生過程における発現パターンの解析を行った。

(2) サンプル2について：ここでは有眼側特異的な色素胞の分化を規定する分子メカニズムを明らかにするため、有眼側で強い発現が見られた遺伝子に着目して解析した。これまでに色素胞分化に関与することが知られている遺伝子、*tyrosinase (tyr)*、*tyrosinase-related protein 1a (tyrpl1a)*、*solute carrier family 24, member 5 (slc24a5)*、*GTP cyclohydrolase 2 (gch2)*や、*purine nucleoside phosphorylase 4a (pnp4a)*が含まれた。これらの遺伝子は *in situ hybridization* により有眼側特異的に発現することが確認された。

これまでに機能解析が行われていない幾つかの遺伝子に着目し、詳細に解析をすることとした。RT-PCRによりクローニングし、*in situ hybridization*により発現を解析したところ、有眼側特異的に色素胞またはその前駆体と思われる細胞で発現が観察された。続いて、機能解析を行うため、実験モデル生物を用いた解析を行っている。ゼブラフィッシュおよびメダカのオーソログを単離して色素胞における発現を調べたところ、ある遺伝子について、ゼブラフィッシュでは発現が見られなかったこと、メダカでは色素胞前駆体において発現が見られたことから、その後の解析はメダカを用いて行うこととした。既知の色素胞分化マーカーとの発現パターンの比較により、これらの遺伝子は白色色素胞および黄色色素胞の系譜で機能することが示唆された。今後はゲノム編集により突然変異体を作成し、色素胞分化における機能を解明したいと考えている。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① Chen Q, Takagi M, Mogi M, Kikuchi M, Saito Y, Nakamura S, Yokoi H, Seikai T, Uji S* and Suzuki T*. (2017). External asymmetry and pectoral fin loss in bamboo sole (*Heteromycteris japonica*): small-sized sole with potential as a Pleuronectiformes experimental model. *Zoolog Sci*, 34:377-385. 査読有
DOI: 10.2108/zs170021
- ② Mogi M, Yokoi H and Suzuki T*. (2017). Analyses of the cellular clock gene expression in peripheral tissue, caudal fin, in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Gen Comp Endocrinol*, 478:858-863. 査読有
DOI: 10.1016/j.ygcen.2017.02.009
- ③ Wu X, Chen Q, Washio Y, Yokoi H and Suzuki T*. (2016). Excess Retinoic Acid

Induces Fusion of Centra by Degenerating Intervertebral Ligament Cells in Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*. *J Exp Zool B Mol Dev Evol*, 326:464-473. 査読有
DOI: 10.1002/jez.b.22717

- ④ Shen J, Yokota S, Yokoi H and Suzuki T*. (2016). Diethylnitrosamine-induced expression of germline-specific genes and pluripotency factors, including vasa and oct4, in medaka somatic cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 478:858-863. 査読有
DOI: 10.1016/j.bbrc.2016.08.039
 - ⑤ Kaneko T, Freeha K, Wu X, Mogi M, Uji S, Yokoi H and Suzuki T*. (2016). Role of notochord cells and sclerotome-derived cells in vertebral column development in fugu, *Takifugu rubripes*: histological and gene expression analyses. *Cell Tissue Res*, 366:37-49. 査読有
DOI: 10.1007/s00441-016-2404-z
 - ⑥ Yokota S, Matsuno R, Kato H, Hashimoto H, Kinoshita M, Yokoi H and Suzuki T*. (2016). Establishment of oct4:egfp transgenic and oct4:egfp / β -actin:DsRed double transgenic medaka lines. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 52:646-653. 査読有
DOI: 10.1007/s11626-016-0020-6
 - ⑦ Ibaraki H, Wu X, Uji S, Yokoi H, Sakai Y and Suzuki T*. (2015). Transcriptome analysis of vertebral bone in the flounder, *Paralichthys olivaceus* (Teleostei, Pleuronectiformes), using Illumina sequencing. *Mar Genomics*, 24:269-276. 査読有
DOI: 10.1016/j.margen.2015.09.009
 - ⑧ Mogi M, Uji S, Yokoi H and Suzuki T*. (2015). Early development of circadian rhythmicity in the suprachiasmatic nuclei and pineal gland of teleost, flounder (*Paralichthys olivaceus*), embryos. *Dev Growth Differ*, 57:444-452. 査読有
DOI: 10.1111/dgd.12222
- [学会発表] (計 18 件)
- ① 横井 勇人、Rotllant Josep、Cal Laura、鈴木 徹、変態期ヒラメの RNA-seq 解析で単離された色素胞分化に関与する遺伝子の解析、平成 30 年度日本水産学会春季大会、2018 年
 - ② Hayato Yokoi、Laura Cal、Josep Rotllant、

Tohru Susuki、Pigmentation genes isolated by transcriptome expression profiling of flounder metamorphosis、2017 年度生命科学系学会合同年次大会、2017 年

- ③ 十川麻衣、茂木淳、横井勇人、鈴木徹、ヒラメの無眼側皮膚に異所的に出現する色素胞の由来について、日本動物学会第 88 回富山大会、2017 年
- ④ 横井勇人、鈴木徹、ヒラメ変態期の左右非対称な形態形成と細胞分化、第 3 回ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会、2017 年
- ⑤ Hayato Yokoi、Minori Kunimasa、Yoshifumi Sakai、Tohru Suzuki、Transcriptome analysis of flatfish metamorphosis identified ocular side biased genes involved in pigmentation、10th European Zebrafish Meeting、2017 年
- ⑥ Tohru Suzuki、Quiran Chen、Susumu Uji、Hayato Yokoi、Small-scale culture system of bamboo sole (*Heteromycteris japonica*), a small-sized species of the Pleuroneciformes, and its metamorphic external asymmetry and pectoral fin loss、50th annual meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (JSDB) cosponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network (APDBN)、2017 年
- ⑦ 國政実里、横井勇人、酒井義文、青海忠久、鈴木徹、給餌条件により生じるヒラメ体色異常の遺伝子発現プロファイリング解析、平成 29 年度日本水産学会春季大会、2017
- ⑧ Hayato Yokoi、Minori Kunimasa、Youhei Washio、Xiaoming Wu、Yoshifumi Sakai、Tadahisa Seikai、Tohru Suzuki、Expression profiling of flatfish, a weird teleost fish that transforms into an asymmetric body plan、The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan、2016 年
- ⑨ 横井勇人、酒井義文、鈴木徹、変態期ヒラメの眼球移動に關与する遺伝子の探索、平成 28 年度日本水産学会春季大会、2016 年
- ⑩ 鈴木徹、鷲尾洋平、烏暁明、國政実里、十川麻衣、横井勇人、ヒラメ、カレイ類の

左右非対称な体色形成と着色異常の発生機構、日本動物学会、2015 年

〔その他〕

ホームページ等

東北大学研究者紹介

<http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/0b42e27653b7f35e08dfd12bc8aceb84.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横井 勇人 (YOKOI HAYATO)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：40569729