

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2019

課題番号：15KK0272

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（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Isolation of genes expressed asymmetrically in the flounder metamorphosis and analysis of regulatory mechanisms by thyroid hormone(Fostering Joint International Research)

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） 10,800,000円

渡航期間： 6ヶ月

研究成果の概要（和文）：ヒラメやカレイなどの異体類は、変態期に左右対称な仔魚から大規模なりモデリングが起こる。異体類は諸外国においても重要な産業対象種を含み、人工飼育下で生じる異常など日本と同様の問題がある。これら共通の問題に国際共同研究として取り組み、異体類の左右非対称な変態のメカニズムの解析を行った。ヒラメで明らかとなっていた左右非対称化の初期の現象をヨーロッパの異体類ターボットで検証したところ、異なった特徴が見られた。またヒラメで単離された変態に関する遺伝子のオーソログ（相同遺伝子）を単離して比較解析した。色素胞分化に関与する遺伝子では、進化的に魚類では保存性が高く、四肢動物とは異なった特徴が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒラメなど水産上重要な魚種では活発に増養殖がおこなわれているが、無眼側の黒化など体色異常や形態の異常が問題である。これらの問題は海外の増養殖においても共通の問題であり、日本産のヒラメとヨーロッパのターボットを比較解析することにより、現象の普遍性と種特異性および進化的な側面について考察をすることができた。また共通の問題に取り組むことで共同研究として連携が生まれ、EUの国際共同研究プログラムにも参加することができた。

研究成果の概要（英文）：Flatfish transform their body plan during metamorphosis. Flatfish are important fish as commercial target and actively produced by aquaculture, however, the abnormalities in pigmentation and malformation are the common issue around the world. In this international collaboration, we investigated the metamorphosis of flatfish comparing Japanese flounder and Mediterranean turbot. New findings include, blind-side specific degeneration of cartilage around eye was specific phenomena for flounder and not observed in turbot; genes involved in pigmentation is conserved among teleost fish but not in several tetrapods.

研究分野：魚類変態の発生遺伝学

キーワード：ヒラメ 異体類 変態 左右非対称化 色素胞分化 トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

ヒラメ・カレイなど異体類は左右対称な仔魚として成長し、変態期に左右非対称な体制へと劇的に変化する。異体類の変態は甲状腺ホルモンによって制御されるが、左右非対称な形態のリモデリングおよび細胞分化について、詳細な分子メカニズムは分かっていない。異体類にはヒラメやホシガレイなど商業的に価値の高い魚種が含まれ、種苗生産が行われているが、人工飼育下では変態の異常との関連が指摘される色素胞分化の異常（有眼側の白化および無眼側の黒化）や眼球移動の異常をはじめとした形態異常が発生して問題となっており、変態の仕組みを理解して異常の低減策を開発することは水産上重要な課題である。我々は変態期ヒラメの有眼側と無眼側で発現強度の異なる遺伝子を網羅的に単離し、変態のトリガーである甲状腺ホルモンによる制御関係を解析した。次世代シーケンサーによる遺伝子発現プロファイル解析を行い、変態に関与する候補遺伝子群を単離し、続いて得られたドライ実験のデータについて、組織発現の解析等のウェットな実験で検証して、変態の左右非対称化に機能する遺伝子のスクリーニングを進めた。研究開始時までと同定した色素胞分化に関与する新規遺伝子や左右非対称な皮膚組織に関与する遺伝子を詳細な解析の候補とし、国際共同研究で生物種間の普遍性や多様性を踏まえて比較解析することを計画した。

2. 研究の目的

日本産のヒラメを用いて遺伝子発現プロファイルを比較し、変態の分子基盤について解析を行ってきたが、変態の分子メカニズムが異体類全体に一般化できる普遍的なことなのか、種特異的なことであるのか検証実験をするため、スペインの国立海洋研究所 Instituto de Investigaciones Marinas, Consejo Superior de Investigaciones Cientificas (CSIC) の Josep Rotllant 博士と国際共同研究として実験を計画した。Rotllant 博士はヨーロッパ産のイシビラメ（ターボット、*Scophthalmus maximus*）を中心に、異体類や小型モデル魚類の色素胞分化について研究している。スペインも水産業が盛んで、イシビラメなど異体類の種苗生産が盛んに行われているが、変態異常個体の出現という日本と同様の問題があった。日本産ヒラメとヨーロッパ産イシビラメを用いて比較しながら解析することにより、普遍的な変態の分子メカニズムの解明に連携して取り組むことができ、また共通の問題に共同研究として取り組むことは、今後の強固な共同研究関係を構築する上でも重要であると考えた。

またヒラメの変態初期に見られる左右非対称な頭部軟骨の退縮について解析するために、ゼブラフィッシュ発生過程の頭部左右軸形成についてドイツ・ハイデルベルグ大学（現イタリア・トレント大学）の Carl 博士と共同で、また脊椎動物の祖先である尾索動物オタマボヤで甲状腺の相同器官である円柱を研究しているバルセロナ大学の Cañestro 博士と共同で、甲状腺ホルモンシグナル伝達システムの進化的側面から共同研究することとした。

3. 研究の方法

(1) ヒラメの変態過程において観察された左右非対称化へのリモデリング形態形成、およびその分子基盤の普遍性と種特異性について：ターボットを用いた比較解析

異体類の左右非対称な形態に至る分子基盤を理解するために、変態初期の左右で発現強度の異なる遺伝子を RNA-seq 解析による遺伝子発現プロファイルの比較によりスクリーニングを実施してきた。解析には左右非対称な眼上棒状軟骨の退縮に着目してサンプルとした。共同研究先のスペインにおいてターボット（ヨーロッパ産イシビラメ）は重要な産業魚種であり、盛んに増養殖が行われている。ターボットの変態初期における頭部の軟骨の発生・分化・退縮について観察して比較検討した。

(2) ヒラメ変態の左右非対称な色素胞分化に関与する遺伝子の小型モデル魚類を用いた解析

異体類の左右非対称な体色の分子基盤を理解するために、ヒラメの有眼側と無眼側で遺伝子発現プロファイルを比較し、発現強度の異なる遺伝子を単離した。これら遺伝子の色素胞分化における機能を明らかにするために、本研究では小型モデル魚類であるゼブラフィッシュおよびメダカの特徴を活かした実験を行うため、まずオーソログ（相同遺伝子）を単離し、発現解析を行った。共同研究者が開発した色素胞分化関連遺伝子の変異体系統や初期左右軸形成攪乱サンプルを利用した解析も行った。

(3) 甲状腺ホルモンシグナル伝達システムの進化について尾索動物オタマボヤを用いた比較解析

異体類の変態は甲状腺ホルモンシグナルで制御されていることが知られており、本研究ではこの制御関係をより単純化して解析するために、脊椎動物の祖先である尾索動物オタマボヤに着目した。オタマボヤは体の作りがシンプルで、ゲノムサイズも小さいことが知られており、進化的な観点から重要な生物である。共同研究者の未発表データについても合わせて解析を行った。

4. 研究成果

(1) ヒラメの変態初期に見られる無眼側特異的な眼上棒状軟骨の退縮について

異体類では変態期に片側の眼が反対側に移動して左右非対称な成魚の形態に変化するが、ヒラメでは眼の配置が左右非対称になる前に、右側（無眼側）の眼上棒状軟骨の退縮が起こる。この現象は変態初期に見られる最初期の左右非対称なイベントの一つであり、無眼側から有眼側に眼が移動する大規模なリモデリング形態形成運動の中で、遺伝子発現プロファイル比較を行うのに適したサンプルであると考えている。この左右非対称な軟骨の退縮について、異体類全体の普遍的な現象であるのか、種特異的な現象であるのか検討するために、ターボットの変態前後のサンプルを使用して、軟骨および硬骨の染色を行い、経時的に観察した(図)。ターボットにおいても、変態前の左右対称な時期に、眼の背側に骨格組織が形成されることが分かった。しかし、ヒラメでは眼上棒状軟骨が左右対称に形成された後、右側のみ退縮するのに対して、ターボットでは、硬骨が左右対称に形成されていた。軟骨の左右非対称な退縮は、ターボットでは共通性は見られなかった。ヒラメのトランスクリプトーム解析で単離された遺伝子群について、ターボットのオーソログを単離したが、中には保存性がかなり低い遺伝子もあり、リモデリングプログラムの相違と関係が考えられた。

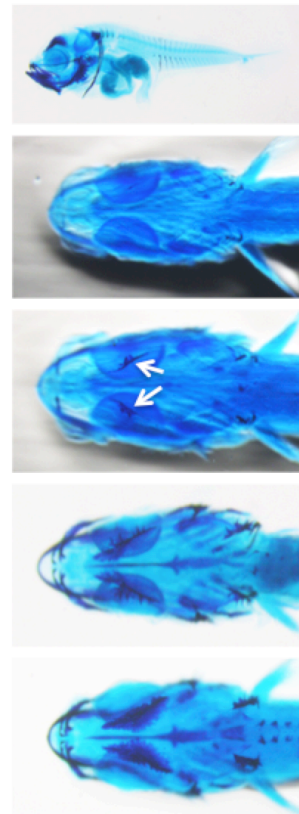


図1 ターボットの骨格染色側面像および頭部背側像
青:軟骨、紫:硬骨
白矢印:眼背側の硬骨

(2) 有眼側で強く発現する色素胞分化に関与する遺伝子のゼブラフィッシュおよびメダカのオーソログ

これまでに RNA-seq 解析により、有眼側で発現が強い遺伝子がスクリーニングされ、色素胞分化に関与することが示唆される遺伝子が多数含まれていた。これらの中で、比較的解析が進んでいなかった遺伝子に着目し、実験モデル魚類のゼブラフィッシュおよびメダカを用いて機能解析を行った。Rotllant 博士はある色素胞分化関連遺伝子ファミリーについてゲノム編集により変異体系統や過剰発現系統を作成しており、これらのリソースを用いて発現への影響を解析した。着目した遺伝子について、比較ゲノムにより進化的な背景を解析したところ、ある遺伝子は魚類、両生類、爬虫類では保存されていたが、鳥類と哺乳類では失われていることが示唆された。また別の遺伝子では、魚類と両生類で確認できたが、それ以外では失われていることが示唆された。この結果は、各生物群における色素胞の種類と関係があるかもしれない。ゲノム編集により変異体および GFP ノックイン系統を作成中であり、これら遺伝子の機能について解析を続けている。

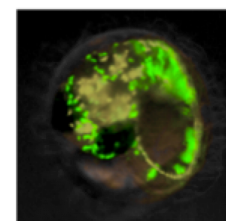


図2 GFPノックインによる遺伝子発現の経時的観察。
緑:GFP、黄:白色素胞

(3) オタマボヤにおける甲状腺ホルモン関連遺伝子群について

オタマボヤはコンパクトなゲノム（約 60Mb）が特徴で、脊椎動物では必須とされる遺伝子が存在しない例も報告されている。遺伝子喪失はシグナル伝達を考える上で重要なヒントを与えてくれると期待される。オタマボヤでは甲状腺ホルモンの産生に関与する thyroid peroxidase 遺伝子は高い保存性を示した一方で、deiodinase や受容体、またホルモンのフィードバックに関わる遺伝子も高い相同性を示すものは見られなかった。オタマボヤでは内柱(endostyle)という脊椎動物の甲状腺相同器官があり、また尾索動物でも甲状腺ホルモンまたはそれに相当するシグナルが存在することが示唆されている。甲状腺ホルモンシグナルに関与する遺伝子のほとんどを失っている可能性があるオタマボヤにおいて、このシグナルがどのような機能をしているのか、進化的にも興味深い。

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 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chen Qiran, Sato Kota, Yokoi Hayato, Suzuki Tohru	4. 巻 334
2. 論文標題 Developmental regulatory system of ocular side specific asymmetric pigmentation in flounder: Critical role of retinoic acid signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution	6. 最初と最後の頁 156 ~ 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jez.b.22934	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 Togawa Mai, Endo Yuna, Suzuki Nobuo, Yokoi Hayato, Suzuki Tohru	4. 巻 330
2. 論文標題 Identification of Sox10 positive cells at the dorsal fin base of juvenile flounder that are correlated with blind side skin ectopic pigmentation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution	6. 最初と最後の頁 427 ~ 437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jez.b.22842	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 Chen Qiran, Yokoi Hayato, Suzuki Tohru	4. 巻 269
2. 論文標題 Expression profiles of RA synthases and catabolic enzymes in newly hatched and metamorphosing larvae of Japanese flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 60 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2018.08.015	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 Chen Qiran, Takagi Masako, Mogi Makoto, Kikuchi Miki, Saito Yudai, Nakamura Shunya, Yokoi Hayato, Seikai Tadahisa, Uji Susumu, Suzuki Tohru	4. 巻 34
2. 論文標題 External Asymmetry and Pectoral Fin Loss in the Bamboo Sole (<i>Heteromycteris japonica</i>): Small-Sized Sole with Potential as a Pleuronectiformes Experimental Model	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Zoological Science	6. 最初と最後の頁 377 ~ 385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2108/zs170021	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 Wu Xiaoming, Chen Qiran, Washio Youhei, Yokoi Hayato, Suzuki Tohru	4. 巻 326
2. 論文標題 Excess Retinoic Acid Induces Fusion of Centra by Degenerating Intervertebral Ligament Cells in Japanese flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i>	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution	6. 最初と最後の頁 464 ~ 473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jez.b.22717	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44件 (うち招待講演 5件 / うち国際学会 16件)

1. 発表者名 中村峻也, 安齋賢, 成瀬清, 鈴木徹, 横井勇人
2. 発表標題 魚類の色素胞分化に関与する遺伝子 <i>dhfr-like</i> および <i>hdd</i> の解析
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 三宅みなと, 鈴木徹, 横井勇人
2. 発表標題 エレクトロポレーションを用いたヒラメ稚魚内の <i>Sox10</i> 陽性色素前駆細胞の <i>in vivo</i> での可視化
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤雄大, 横井勇人, 宇治督, 鈴木徹
2. 発表標題 RNA-seqで明らかになった小型異体類、ササウシノシタの仔魚発生・変態期における遺伝子発現プロファイルの変化
3. 学会等名 日本動物学会 第90回 大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayato Yokoi, Shunya Nakamura, Satoshi Ansai, Kiyoshi Naruse, Tohru Suzuki
2. 発表標題 dhfr and hdd, genes involved in pigment cell differentiation isolated by transcriptome analysis of flounder metamorphosis
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Co-sponsored by APDBN (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊池美希、齋藤雄大、遠藤優女、陳其然、横井勇人、宇治督、鈴木徹
2. 発表標題 ササウシノシタ(<i>Heteromycteris japonica</i>)仔魚における鱗神経回路の発生と色素前駆細胞の局在
3. 学会等名 日本動物学会 第89回 札幌大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤雄大、篠原怜、松田直往、田川正朋、横井勇人、鈴木徹
2. 発表標題 ヒラメの着色型黒化進行に伴う脳と皮膚のtranscriptomeの変化
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 陳其然、横井勇人、鈴木徹
2. 発表標題 RNA-Seq screening of up- and down-regulated genes by retinoic acid in metamorphosing flounder larvae
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村峻也、安齋賢、成瀬清、鈴木徹、横井勇人
2. 発表標題 色素胞分化に関する新規遺伝子の解析
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Suzuki T, Chen Q, Uji S and Yokoi H
2. 発表標題 Small-scale culture system of bamboo sole (<i>Heteromycteris japonica</i>), a small-sized species of the Pleuroneciformes, and its metamorphic external asymmetry and pectoral fin loss
3. 学会等名 50th annual meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists (JSDB) cosponsored by the Asia-Pacific Developmental Biology Network (APDBN) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Suzuki T, Mogi M and Yokoi H
2. 発表標題 RHYTHMIC PER2 EXPRESSION AT THE SUPRACHIASMATIC NUCLEUS OF THE JAPANESE FLOUNDER, <i>PARALICHTHYS OLIVACEUS</i> , AND ITS IMPLICATIONS FOR CIRCADIAN CLOCK MECHANISM
3. 学会等名 18th International Congress of Comparative Endocrinology (ICCE18) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yokoi H, Kunimasa M, Sakai Y and Suzuki T
2. 発表標題 Transcriptome analysis of flatfish metamorphosis identified ocular side biased genes involved in pigmentation
3. 学会等名 10th European Zebrafish Meeting (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yokoi H, Qiran C, Canestro C, Postlethwait JH and Suzuki T
2. 発表標題 Whole genome duplication and diversification of gene function in teleosts: lessons from Fgfr1, Sox9 and Aldh genes
3. 学会等名 XI Congress of Iberian Association for Comparative Endocrinology (AIEC) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 横井 勇人、鈴木 徹
2. 発表標題 ヒラメ変態期の左右非対称な形態形成と細胞分化
3. 学会等名 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
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 十川 麻衣、茂木 淳、横井 勇人、鈴木 徹
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本動物学会 第88回 富山大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yokoi H, Cal L, Rotllant J and Susuki T
2. 発表標題 Pigmentation genes isolated by transcriptome expression profiling of flounder metamorphosis
3. 学会等名 2017年度生命科学系学会合同年次大会、第40回日本分子生物学会年会、第90回日本生化学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 横井勇人、Rotllant Josep、Cal Laura、鈴木徹
2. 発表標題 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
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 國政実里、青海忠久、鈴木徹、横井勇人
2. 発表標題 ブラジル産とユタ産アルテミアを与えたヒラメ変態期仔魚で発現量の異なる遺伝子のRNA-Seqによるスクリーニング
3. 学会等名 日本水産学会秋季大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 Yokoi H, Kunimasa M, Washio Y, Wu X, Sakai Y Seikai T and Suzuki T
2. 発表標題 Expression profiling of flatfish, a weird teleost fish that transforms into an asymmetric body plan
3. 学会等名 The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology and the 87th Meeting of the Zoological Society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 十川麻衣、茂木淳、横井勇人、鈴木徹
2. 発表標題 ヒラメ再生皮膚に現れる色素前駆細胞と色素胞の分布
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yokoi H, Chen Q, Canestro C, Postlethwait JH, Suzuki T	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Universida de Vigo	5. 総ページ数 199; pp27-32
3. 書名 Whole genome duplication and diversification of gene function in teleosts: lessons from Fgfr1, Sox9 and Aldh genes. In "Advances in Comparative Endocrinology, vol IX".	

〔産業財産権〕

〔その他〕

東北大学研究者紹介 http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/0b42e27653b7f35e08dfd12bc8aceb84.html
--

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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	ロトリヤント ジョセップ (Rotllant Josep)	スペイン国立海洋研究所・CSIC, Vigo・Group leader	
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	カール マティアス (Carl Matthias)	イタリア・トレント大学・Department of Cellular, Computational and Integrative Biology - CIBIO・Assistant Professor	申請時：ドイツ・ハイデルベルグ大学
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	カニエストロ クリスティアン (Canestro Cristian)	スペイン・バルセロナ大学・Department of Genetics・Associate Professor	