

令和 5 年 6 月 29 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18H02276

研究課題名(和文)新たに同定された「季節センサー」血管囊の機能解析が解き明かす魚類の季節繁殖の謎

研究課題名(英文)Analyses of the functions of the saccus vasculosus of fish in the regulation of seasonal reproduction

研究代表者

飯郷 雅之(Igo, Masayuki)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：10232109

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文):短日繁殖魚であるアユ, サクラマスを対象に重点的に研究を進めた。mRNA-seqを行い、血管囊, 松果体, 網膜, 脳, 下垂体などで発現する遺伝子のカタログ化と, 季節繁殖制御遺伝子群, 光受容体遺伝子群, 温度受容体遺伝子群などの網羅的同定を行なった。また, 那珂川で7月-10月に採取された天然アユの血管囊, 脳, 下垂体などからtotal RNAを抽出し, Lasy-SeqによるmRNA-seqを行い, 全遺伝子のmRNA量の変化を明らかにした。サクラマスの血管囊王冠細胞のシングルセルmRNA-seqを行い, 個々細胞の遺伝子発現プロファイルを明らかにした。脳の透明化も試みた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

1685年に解剖学的に記載された脳の底部に位置する血管囊の機能は300年以上にわたって不明であった。この血管囊が「季節センサー」として機能することは2013年に判明したが, 脳内の「性中枢」にどのようにして季節情報が伝達されているのかは不明であった。本研究においては, 魚類の生殖制御に関わる「季節センサー」と「性中枢」のネットワークを, 古典的な解剖学・生理学・内分泌学的手法と次世代シーケンサーを活用した機能的ゲノミクス解析により包括的に解明し, 魚類の季節繁殖を制御する脳内分子機構を解明することを試みた。基礎科学的側面のみならず, 水産増養殖の高度化にも直結する研究成果が得られた。

研究成果の概要(英文): Ayu *Plecoglossus altivelis* and masu salmon *Oncorhynchus masou* (short-day breeders) were used as experimental models. mRNA-seq analyses revealed gene expression profiles in several organs including saccus vasculosus, retina, pineal organ, brain, pituitary gland. Genes involved in seasonal reproduction, photoreception and thermal signal transduction were identified. Gene expression profiles in wild ayu collected in Nakagawa River were analysed by Lasy-Seq. Single cell mRNA-seq analyses also revealed gene expression profiles in individual cells in the saccus vasculosus and pituitary gland in masu salmon.

研究分野: 魚類生理学, 時間生物学

キーワード: 季節繁殖 性中枢 血管囊 光受容体 温度受容体 mRNA-seq シングルセル解析

## 1. 研究開始当初の背景

アリストテレス (BC384-322) が『動物記』に「動物の行動はすべて交尾や産卵や食物の獲得に関係があり、寒さや暑さや季節の移り変わりに適応している」と記して以来、2300年以上にわたって動物が環境の季節変化に適応し、春夏秋冬の四季それぞれの季節に適応した季節リズムを示すことは古くから知られていた。しかしながら、動物の季節性を支配する分子機構は解明されていなかった。

申請者は魚類を含む脊椎動物を対象として、環境情報の受容から生殖制御に至る脳内ネットワークの全貌解明を目指して研究を推進してきた。生殖リズムの確立における光、水温など環境の役割や、光情報の脳内伝達機構について松果体ホルモンであるメラトニンや光受容体を対象に研究を進め、最近では体内時計・光周時計の時刻情報を支配する時計遺伝子の研究を進めてきた。

1997年より、名古屋大学大学院生命農学研究科の吉村崇と、長日繁殖型の鳥類ウズラをモデルとした季節繁殖の分子機構解析のための共同研究を開始した。ウズラは短日条件下での暗期の照射により黄体形成ホルモンの分泌が促進され、繁殖期に入るという極めて鋭敏な光周性を示す。この性質を利用して、cDNA サブトラクション法により照射により誘導される候補遺伝子 150 個の中から、真の季節繁殖の鍵分子である甲状腺ホルモン転換酵素 *iodothyronine deiodinase type II (Dio2)* を世界に先駆けて 2003 年に同定した (*Nature* 426: 178-181, 2003)。さらに、ウズラを短日条件から長日条件に移行する際に 3 日間にわたって 4 時間ごとに視床下部のサンプリングを行い、DNA マイクロアレイによる機能的ゲノミクス解析を行い、*Dio2* を制御する因子は下垂体隆起葉に発現する甲状腺刺激ホルモン (TSH) であることを 2008 年に明らかにした (*Nature* 452: 317-323, 2008)。

2001 年にウズラの *Dio2* が季節繁殖の鍵分子であることがわかってきた頃、魚類の季節繁殖にも *Dio2* が重要な役割を果たしているに違いないと予測し、魚類の季節繁殖における *Dio2* の作用解析を開始した。短日繁殖型魚類であるサクラマス早熟♂をモデルとして検討を行ったところ、脳の底部に位置する血管嚢に *Dio2* が日長の長短に反応して発現することがわかった。この血管嚢は 1685 年に Collins により解剖学的に記載されていたが、その機能は未知の器官であった。続いて、申請者はサクラマスの光受容体遺伝子 11 種の網羅的 cDNA クローニングを行い、これらの遺伝子の発現部位を調べたところ、血管嚢自身に光受容体が発現していることが判明した。さらに時計遺伝子 3 種の cDNA クローニングを行い、発現部位を調べたところ、血管嚢自身が季節繁殖を制御する光周時計を持つことが示された。さらに、*in vitro* で培養した血管嚢においても光周反応が確認され、さらに外科手術により血管嚢を除去すると短日条件において惹起される生殖腺の発達が抑制されることを明らかにした。これらの結果から、サクラマスの血管嚢は「季節センサー」として機能することが解明された (*Nature Communications* 4: 2108, 2013)。

## 2. 研究の目的

脊椎動物全般を通じて、*Dio2* が季節繁殖の鍵分子として働いている可能性が示唆された。魚類の成熟を制御するのは「性中枢」である視床下部・下垂体・生殖腺系である。そこで、「血管嚢の『季節センサー』から脳内の『性中枢』にどのようにして季節の情報が伝えられているのだろうか？」という疑問が生じた。また、繁殖期の光周性には、長日繁殖型、短日繁殖型という正反対の反応が存在する。「温帯域の季節繁殖を行う魚類のうち、長日繁殖型魚類と短日繁殖型魚類の生殖制御システムはどこまで共通でどこから異なるのだろうか?」、「季節繁殖を行う魚類と通年繁殖可能な熱帯域の魚類の生殖制御システムはどこが共通でどこが異なるのだろうか?」という課題も解決しなければならない。これらの疑問を解決し、魚類の成熟に関わる光周性の普遍性と魚種毎に異なる特殊性を包括的に理解し、魚類の増養殖の効率化・高度化に資する研究成果を得るべく本研究は企画された。

## 3. 研究の方法

### (1) 血管嚢、脳、下垂体、生殖腺などで発現する遺伝子のカタログ化と、季節繁殖制御遺伝子群の網羅的同定

短日繁殖魚であるアユを主な研究対象として、血管嚢、脳、下垂体、生殖腺、頭腎などを採取し、次世代シーケンサーによる網羅的 mRNA 塩基配列決定 (mRNA-Seq) に供した。得られた塩基配列をアセンブルし、アユの生理・行動を制御する遺伝子群の網羅的同定を試み遺伝子カタログを作成した。また、成魚アユの 20 器官について DNBSAQ による mRNA-seq で得られたリードをアユの遺伝子カタログにマッピングした。さらに、さまざまな成長ステージのアユの器官(脳、

下垂体) について, Lasy-Seq による mRNA-seq を行い, 得られたリードをアユの遺伝子カタログにマッピングし, mRNA 量の変化を調べた。

### (2) サクラマス未熟オスと早熟オスの標準体長, 体重, 生殖腺指数, 肝臓指数, 肥満度, 血中ホルモン濃度, および季節繁殖関連遺伝子群の発現量比較

2018年10月15日にサクラマスの採血と試料採取を行った。組織は液体窒素で瞬間凍結し-80°Cで保存した。生殖腺体重比により早熟オス, 未熟オスに分類し, 以降の解析に用いた。RIAによりサクラマスの組織および血漿の甲状腺ホルモンおよびテストステロン濃度を測定した。組織から total RNA を抽出し, 逆転写した cDNA をテンプレートとし, qPCR により増幅した。標準曲線を描き絶対定量を行った。18S rRNA の発現量により標準化を行い, さらにピークを 100% として標準化を行った。測定結果は, 未熟オスと早熟オスの間で t-test により統計処理を行った。

### (3) サクラマスの血管囊における scRNA-seq

サクラマス血管囊を採取し, 組織を細切した後, コラーゲナーゼ/DNase 処理により細胞を分散した。ポリ-L-リジンコートしたレーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) 用スライドガラスまたは培養フラスコに細胞を播種し, 10%ウシ胎児血清を含む L15-Medium 中, 明暗条件下 (明期 6-18 時, 暗期 18-6 時), 15°C で翌日まで培養した。LCM 法ではメタノール固定, 乾燥後, -80°C で保存した。ArcturusXT Laser Capture Microdissection System により 25 個の血管囊王冠細胞を単離し, SMART-seq v4 ultra Low Input RNA Kit と Nextera XT DNA Library Prep Kit を用いてライブラリーを作成し, MiSeq によりシーケンスした。Fluidigm-C1 法では, 集積流体回路を用いて 96 個のシングルセル候補を単離し, ライブラリーの調整を行い, HiSeq を用いてシーケンス解析を行った。得られたシーケンスをトリミングした後, 光受容体遺伝子群, 光シグナルトランスダクション関連遺伝子群, 季節繁殖関連遺伝子群, 下垂体前葉ホルモン遺伝子群の翻訳領域の塩基配列にマッピングし, それぞれの遺伝子の発現量を定量化した。また, クラスタリングを行い, ヒートマップを作成した。

### (4) 脳の透明化

サクラマスを麻酔し, 4%パラホルムアルデヒドで灌流した後, 脳を摘出した。透明化試薬 CUBIC を用いて透明化を行い, SYTO9 により細胞の核染色を行った。THUNDER システムを用いて全脳と血管囊の観察を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 血管囊, 脳, 下垂体, 生殖腺などで発現する遺伝子のカタログ化と, 季節繁殖制御遺伝子群の網羅的同定

アセンブルによって得られたコンティグを用いて BLAST 検索を行った結果, 多くの遺伝子が同定された。光受容体, 温度受容体など, 生理・行動を制御する遺伝子群, 計 50 個の cDNA 翻訳領域全長の塩基配列と, 31 個の cDNA 部分塩基配列が同定された。アユ成魚の全身 20 器官の mRNA-seq データを用いた mRNA 量解析では, 各器官で異なる遺伝子発現パターンが見られた。

Lasy-Seq による脳, 下垂体の mRNA-seq 解析の結果, 各ステージ間で候補遺伝子群について興味深い mRNA 量の変化が見られた。さらに, アユの遺伝子モデルに本研究で Lasy-Seq による mRNA-seq で得られたリードをマッピングし UMAP と Heatmap で表現した。候補遺伝子群の以外で mRNA 量の変化が見られた遺伝子の抽出を行った。

### (2) サクラマス未熟オスと早熟オスの標準体長, 体重, 生殖腺指数, 肝臓指数, 肥満度, 血中ホルモン濃度, および季節繁殖関連遺伝子群の発現量比較

標準体長, 肝臓指数, 肥満度については早熟オス, 未熟オスの間に有意な差はみられず, 体重, 生殖腺指数, 血中テストステロン濃度には, 早熟オス, 未熟オスの間に有意な差がみられた。甲状腺ホルモン濃度の測定では, 血中で, T4, T3 とともに早熟オス, 未熟オスの間に有意差がみられた。血管囊および脳における T4 および T3 含量は測定限界以下の個体が多く, 下垂体における T4 含量はおよび T3 含量は, とともに 40-60 pg/下垂体で, 早熟オス, 未熟オスの間に有意な差はなかった。

qPCR による成長と性成熟に関連する遺伝子群発現量の定量では, 脳, 血管囊, 下垂体に EYA3, DIO2, TSHB, GPA1, GnRH3b, FSHB, SMTL が, 脳に GnRH3a が, 脳と下垂体に KISS2 が, 下垂体に GPA2, LHB, GH, PRL の発現が確認された。これらの中で未熟オスの方が有意に高かったのは, 脳の TSHB であった。早熟オスの方が有意に高かったのは, 血管囊の TSHB, 下垂体の GPA1 と GPA2 と LHB, 脳の DIO2, 脳と下垂体の KISS2, 血管囊の SMTL であった。

サクラマス早熟オスの成熟が, EYA3-TSHB-DIO2-KISS2-GnRH3-FSHB/LHB という遺伝子発現カスケードにより促進されてテストステロン上昇が惹起され, 性成熟が促進するのではないかと考え, 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR により測定することにより検証した。早熟オスで発現量が有意に増加した遺伝子は, 血管囊では TSHB と SMTL, 脳では DIO2 と KISS2, 下垂体では KISS2, GPA1, GPA2, FSHB, LHB であった。これらの結果から, 血管囊で受容された光情報は TSH を介し

て脳に伝達され、DIO2 遺伝子, 続いて KISS2 遺伝子の発現を誘導し, 下垂体からの FSH と LH の分泌を促進しているものと考えられる。

### (3) サクラマスの血管囊における scRNA-seq

LCM 法では 21 個の王冠細胞からシングルセル由来のシーケンスが得られた。光受容体遺伝子では RH1, RH2B, SWS1, SWS2 の発現が確認された。ヒートマップ解析の結果, 21 個の細胞の中に明確なクラスター形成は認められなかったが, 1 細胞が他の細胞と異なるクレードを形成し, RH1 と RH2B を発現していた。また, RH1 と SWS2 を発現していた細胞も 1 つあった。Fluidigm-C1 法では, 得られた 54 個のシングルセル由来のシーケンスのうち 30 個が質の高いシーケンスであった。オプシン遺伝子の発現が確認された細胞は 2 細胞のみであったが, G タンパク質では, GNAT1, GNAT2, GNAQ1, GNA11A, 効果器 (酵素) では, PDE5A, PDE6D, PDE9A の発現が多くの細胞で確認された。ヒートマップ解析の結果, 30 個の細胞の中に明確なクラスター形成は認められなかった。

本研究で scRNA-seq の対象となった細胞数が少なく, 細胞の個性を明らかにするために十分な数のシングルセル由来のシーケンスを得ることはできなかった。今後は多様な細胞サイズにも対応し, 数百から数万個の細胞を一度に解析することが可能である Chromium システムを用いた scRNA-seq によりサクラマス血管囊の王冠細胞の個性が解明されることが期待できる。

### (4) 脳の透明化

CUBIC によりサクラマスの脳を透明化することに成功した。SYTO9 染色により血管囊の内腔の構造を観察することもできた。今後は CUBIC 処理とともに多重蛍光免疫染色により, 血管囊を含む脳全体における光受容細胞の分布や, 光受容細胞の個性をタンパク質レベルで 3 次元的に観察することが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 加藤真由佳, 関真秀, 鈴木稯, 飯郷雅之
2. 発表標題 サクラマス血管囊の王冠細胞に個性はあるのか? シングルセルRNA-seqによる解析
3. 学会等名 日本時間生物学会第26回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 深田陽平, 飯塚みなみ, 加藤真由佳, 福山明音, 岸美里, 岩本昂樹, 飯郷雅之
2. 発表標題 コイ科魚類における季節繁殖の分子機構の解明
3. 学会等名 第43回日本比較内分泌学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Masayuki Iigo
2. 発表標題 From the era Aristotle to modern science: How animals can tell the season
3. 学会等名 International Workshop on Bioimaging (IWBI2019) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 26. 飯郷雅之
2. 発表標題 魚類養殖における体内時計研究成果の産業利用. シンポジウム「産業利用が始まっている体内時計研究」.
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度東京大会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 飯郷雅之
2. 発表標題 いろいろな生き物，いろいろなリズム
3. 学会等名 第29回日本時間生物学会学術大（招待講演）
4. 発表年 2022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

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