

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26430189

研究課題名(和文) ゲノム編集によるショウジョウバエの環境適応の解析

研究課題名(英文) Genome research elucidating environmental adaptation of Dark-fly

研究代表者

布施 直之 (Fuse, Naoyuki)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号：80321983

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)：本研究は、62年間に渡って暗闇で継代されたショウジョウバエ系統(暗黒バエ)を用いて、環境適応の分子メカニズムを明らかにすることを目的とした。

暗黒バエのゲノム多型(SNP)を同定するために、次世代シーケンサーを用いて全ゲノム配列を決定し、約22万のSNPを同定した。暗闇適応に関わるSNPを同定するために、暗黒バエと野生型バエを混合した集団を明所と暗所で継代した。SNPを指標とした集団ゲノムの解析から、暗所で選択されるゲノム領域を絞り込み、暗闇適応に関わる候補として84遺伝子を同定した。暗黒バエのSNPを野生型バエに導入するために、ゲノム編集技術を用いて遺伝子ノックイン法の確立を目指した。

研究成果の概要(英文)：Organisms are remarkably adapted to diverse environments, but molecular mechanism underlying environmental adaptation still remains elusive. To address this issue, we utilize a unique *Drosophila* line, "Dark-fly", which has been maintained for 62 years in a constant dark condition.

We determined whole genome sequence of Dark-fly using next-generation sequencer and identified approximately 220,000 single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the Dark-fly genome. To identify SNPs associated with dark-adaptation, we reared mixed populations of Dark-fly and the wild type fly in light and dark conditions. Our analyses of population genome detected environment-dependent selections of the Dark-fly genome. We consequently listed 84 candidate genes potentially involved in the adaptation of Dark-fly. We currently aim to clarify the roles of Dark-fly's SNPs in environmental adaptation using genome editing technology.

研究分野：ゲノム科学

キーワード：環境適応 ショウジョウバエ ゲノム トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

生物は地球上の様々な環境に適応し進化してきた。近年のゲノム科学の進歩によって様々な生物種のゲノム配列が決定されているが、ゲノムと環境適応を結びつけた例は少なく、環境適応の分子メカニズムは未だ多くの謎が残されている (Barrett, 2011, Nat Rev Genet 12, 767)。本来、生物は環境の変化に対して、柔軟に形質を変化させる可塑性をもつとともに、変化に左右されない頑強性も備えている。この可塑性と頑強性のバランスが環境適応のために重要であり、生物進化の原動力になっていると考えられているが、そのメカニズムはよくわかっていない。

京都大学動物学教室において、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) が 62 年間 1500 世代に渡って暗闇で継代されてきた (Mori, 1986, Zool Sci 3, 945, Fuse, 2014, "Evolution in the Dark", Springer)。この「暗黒バエ」は形態的に大きな異常がないが、明所よりも暗所で繁殖率が高く、野生型ハエとの競合条件においても暗闇で優位に子孫を残すことがわかった。この結果は、暗黒バエが暗闇に適応していることを示唆している。暗黒バエの適応形質の分子基盤を探るために、私達は、次世代シーケンサーを用いて、暗黒バエの全ゲノム配列を決定した。野生型ハエのゲノムとの比較から、暗黒バエのゲノムに約 22 万の 1 塩基多型 (SNP) を同定した (Izutsu, 2012, Plos One 7, e33288)。しかし、この段階では、実際にどの SNP (どの遺伝子) が暗闇適応に関わるのか、明らかではない。

2. 研究の目的

本研究は、暗黒バエの暗闇適応に関わる遺伝子を同定し、環境適応の分子メカニズムを明らかにすることを目的とする。そのために、(1) 網羅的な解析から適応遺伝子を絞り込む、(2) 特定の遺伝子に注目して適応的役割を調べる、という 2 つのアプローチを並行して進めた。

3. 研究の方法

(1) 暗黒バエの全ゲノム解析で同定した約 22 万の SNP のうち、実際にどの SNP が暗闇適応に関与するのか明らかではない。暗闇適応に関与する SNP をゲノムワイドに同定するために、環境による SNP の再選択実験を行った。すなわち、暗黒バエと野生型ハエを混合した大規模集団 (約 1000 匹) を通常の 12 時間周期の明暗条件 (LD 条件) と恒常的な暗条件 (DD 条件) で継代した。継代を繰り返す中で、暗闇適応に関与する SNP は、DD 条件で飼育した集団で頻度が上昇することが予想される (Fig. 1)。22 世代目と 49 世代目の集団からゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて集団ゲノムの解析を行った。暗黒バエ SNP の集団内頻度を計算し、暗闇環境で特異的に選択されるゲノム領域を探索した。

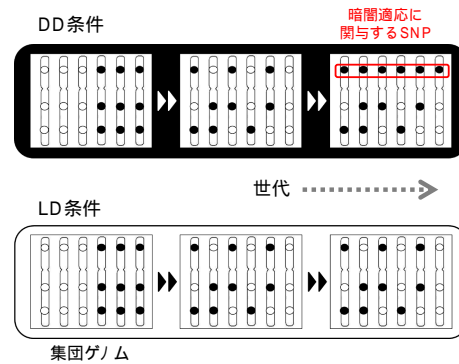


Fig. 1 SNP の再選択実験のモデル図

暗黒バエと野生型ハエの混合集団を DD と LD 条件で継代した。集団ゲノムの中で、暗黒バエの SNP (黒丸) と野生型ハエの SNP (白丸) は混ざり合い、暗闇適応に関与する SNP は、DD 条件の集団で優位になることが予想される。

もう 1 つの網羅的アプローチとして、トランスクリプトーム解析を行った。生物は環境に応答して遺伝子発現を可塑的に変化させるが、特定の環境に適応した生物では、この可塑性が失われている可能性がある。また逆に、環境変化に左右されない頑強な遺伝子発現が適応生物では変動している可能性もある。遺伝子発現の環境変化を調べることで、暗黒バエの環境適応のメカニズムに迫ろうとした。具体的には、暗黒バエと野生型ハエを LD 条件と DD 条件で飼育し、RNA-Seq によるトランスクリプトーム解析を行った。

(2) 特定の遺伝子に注目して、その適応的な役割を調べる実験も行った。暗黒バエのゲノムには、28 遺伝子に終止コドン挿入するナンセンス変異がある。ナンセンス変異は蛋白質の機能に重大な影響を与えるので、これらの変異が暗黒バエの形質に関連している可能性がある。私達は、そのうちの 1 つ、機能未知のロドプシン (Rh7) 遺伝子に注目した。ロドプシンは光を受容する G 蛋白質共役型レセプターであり、ショウジョウバエは 7 つのロドプシン遺伝子をもつ。そのうち Rh1 から Rh6 については機能が詳しく調べられている (Wernet, 2004, Trends Cell Biol 14, 576) が、7 番目のロドプシン Rh7 の機能は不明であった。暗黒バエのナンセンス変異は Rh7 の C 末端領域にあり、結果として暗黒バエでは 21 アミノ酸、短い蛋白質が合成されている (Izutsu, 2012, Plos One 7, e33288)。Rh7 遺伝子の本来の機能と、暗黒バエの変異の役割を明らかにすることを目指した。

近年のゲノム編集技術の進歩により、特定の遺伝子のノックアウト (KO) 系統を効率良く作製することが可能となった。CRISPR/Cas9 のシステムを用いて、Rh7 遺伝子の KO 系統の作製を試みた。また、暗黒バエの変異を野生型ハエに導入するために、さらには暗黒バエの変異を野生型ハエの配列に置換するために、遺伝子のノックイン (KI)

系統の作製法を検討した。

4. 研究成果

(1) 暗黒バエと野生型ハエの混合集団を LD 条件または DD 条件で継代し、22 世代と 49 世代目の集団のゲノム DNA を解析した。暗黒バエの SNP は、継代を繰り返す中で頻度が漸進的に変化した。ゲノム全体の SNP 頻度の特徴を多変量解析によって調べたところ、同じ環境 (LD または DD 条件) で飼育したレプリカ集団間と比較して、異なる環境 (LD vs DD) で飼育した集団間では相違性が高く、世代を経るに従って相違性が高くなることがわかった。この結果は、暗黒バエの SNP の頻度はゲノム全体で見るとランダムな変化よりも環境依存的な変化が多いことを示し、当初の目的の環境による SNP の再選択ができていていることが示唆された。個々の SNP について頻度の時系列変化を解析したところ、DD 条件の集団で優位になる約 6000 の SNP を同定し、これらの SNP が 3 つの選択パターン (DD で正の選択、LD で負の選択、その両方) に分離することを見いだした (Fig. 2)。このことは、暗黒バエに少なくとも 3 つの適応形質があることを示唆している。さらに、統計学的手法を用いて、暗闇で選択されるゲノム領域を全ゲノムの約 0.3% の領域に絞り込んだ。この領域には 84 遺伝子が含まれており、これらを暗闇適応に関わる候補遺伝子として同定した。この中には、嗅覚や神経ペプチドのシグナルに関与する遺伝子や概日リズムで制御される遺伝子が複数含まれていた。今後、個々の遺伝子の機能と適応的な役割を調べる必要がある。これらの結果は、論文 3 に発表し、概要を総説 1 に紹介した。

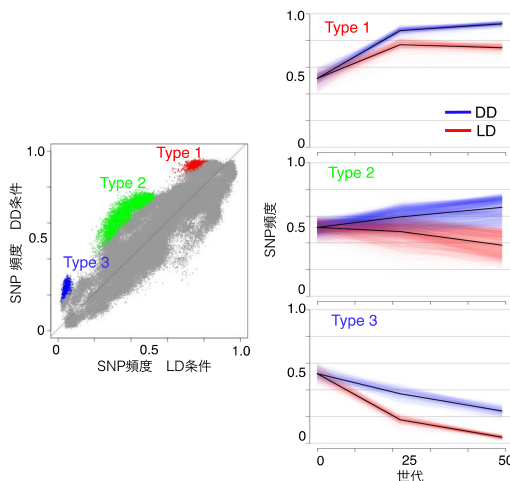


Fig. 2 LD/DD 条件における暗黒バエ SNP の頻度変化 (左) 49 世代目の集団内の暗黒バエ SNP (各点) の頻度を LD/DD 条件で比較した。DD 条件で優位になる SNP は、3 つのタイプ (赤、緑、青) に分類された。(右) 各タイプの SNP の頻度の時系列変化。タイプ 1 は DD で正の選択、タイプ 3 は LD で負の選択、タイプ 2 はその両方の選択が働いている。

暗黒バエの遺伝子発現を調べるために、トランスクリプトーム解析を行った。明暗の LD 条件と暗闇の DD 条件を比較すると、野生型ハエでは約 100 遺伝子の発現が変動したが、暗黒バエでは変動しなかった。これらの遺伝子の多くは概日リズムで制御され、様々な生理機能に関わる遺伝子であった。このことから、暗黒バエでは、明暗周期で変動する遺伝子発現制御が失われていることが示唆され、概日リズムで制御される様々な生理機能が変化している可能性が示唆された。これらの結果をまとめた論文を現在、準備中である。(2) 暗黒バエのゲノム変異を野生型ハエに導入するために、ゲノム編集技術 (CRISPR/Cas9 システム) を用いた遺伝子 KO 法と KI 法の確立を目指した。in vitro 合成した Cas9 mRNA とガイド RNA を胚にインジェクションすることで、目的の遺伝子を効率良く KO できる方法を確立した。注目している Rh7 遺伝子について、KO 系統を作製することができた。さらに、KI 系統の作製のために条件検討を行っている。最近、ガイド RNA が認識する配列に変異を入れた ssDNA を用いた 2 段階の KI を行うことで、培養細胞で目的の変異を効率良く KI できる方法が報告された (Paquet, 2016, Nature 533, 125)。今後、この方法をショウジョウバエに応用し、ゲノム配列を任意の配列に置換できる KI 法の確立を目指す (Fig. 3)。

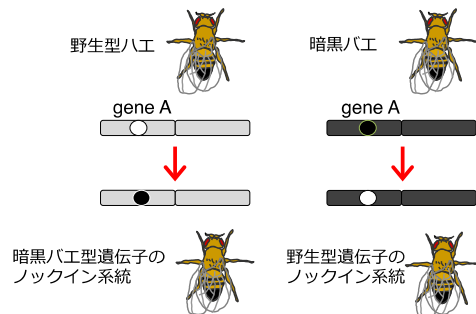


Fig. 3 ゲノム編集による SNP の役割の検証
暗黒バエ SNP (黒丸) を導入した野生型ハエ (左) SNP を野生型 (白丸) へ置換した暗黒バエ (右) のノックインシステムを作製し、その表現型を調べることで、SNP の役割を検証する

最近、ショウジョウバエの Rh7 遺伝子が脳で発現し、概日リズムを制御することが報告された (Ni, 2017, Nature 545, 340)。暗黒バエの行動の概日リズムは過去に調べられており、LD から DD 条件に移行してもリズムが維持されることが示されている (Imafuku, 2011, Zool Sci 28, 195)。しかし、概日リズムは行動だけではなく、様々な生理機能を制御するので、今後、暗黒バエの生理機能を詳細に解析する必要がある。さらに、Rh7 遺伝子の KO や KI 系統に関しても、概日リズムを調べ、暗黒バエの暗闇適応への関与を検証する。

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 5 件)

(1) Fuse, N.* (2017). Genome research elucidating environmental adaptation: Dark-fly project as a case study. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 45, 97–102.

DOI: 10.1016/j.gde.2017.03.004

総説 査読有 *corresponding author

(2) Nakanoh, S., Fuse, N., Tadokoro, R., Takahashi, Y., and Agata, K. (2017). Jak1/Stat3 signaling acts as a positive regulator of pluripotency in chicken pre-gastrula embryos. *Dev. Biol.* 421, 43–51.

DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.11.001

論文 査読有

(3) Izutsu, M., Toyoda, A., Fujiyama, A., Agata, K., and Fuse, N.* (2016). Dynamics of Dark-fly genome under environmental selections. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 6, 365–376.

DOI: 10.1534/g3.115.023549

*corresponding author

論文 査読有

(4) Nakanoh, S., Fuse, N., Takahashi, Y., and Agata, K. (2015). Verification of chicken nanog as an epiblast marker and identification of chicken pouv as pou5f3 by newly raised antibodies. *Dev. Growth Differ.* 57, 251–263.

DOI: 10.1111/dgd.12205

論文 査読有

(5) Tanaka, K. M., Takahashi, A., Fuse, N., and Takano-Shimizu-Kouno, T. (2014). A novel cell death gene acts to repair patterning defects in *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 197, 739–742.

DOI: 10.1534/genetics.114.163337

論文 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

(1) 布施直之

「ゲノムの視点から迫るショウジョウバエの暗闇適応のメカニズム」

第8回 Evo-devo 青年の会(2015)「進化の実証を試みる」

2015年6月27日 名古屋大学・愛知県

(2) 布施直之

「ゲノムの視点から迫る環境適応のメカニズム」

奈良先端未来開拓コロキウム(2014)「生体機能を司る細胞間ネットワーク制御機構の最前線」

2014年12月19日 奈良先端科学技術大学院大学・奈良県

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

暗黒バエのゲノム解析の結果をまとめた論文(3)を発表した際、京都大学広報課でプレスリリースを行った。海外では、Nature 誌や Science 誌、アメリカ遺伝学会(GSA)の Web ニュースでも取り上げられ、アメリカの一般向けの科学雑誌(The Scientist)でも研究内容が紹介された。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

布施 直之 (FUSE, Naoyuki)

東北大学・薬学研究科・助教

研究者番号: 80321983