

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07163

研究課題名(和文)脊椎動物の季節繁殖を司る日長測時機構の解明

研究課題名(英文) Study on the mechanisms of photoperiodic time measurement regulating seasonal reproduction in vertebrates

研究代表者

大竹 愛(四宮愛)(Otake, Ai)

基礎生物学研究所・季節生物学研究部門・特任助教

研究者番号：60452067

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：季節繁殖動物は日照時間(日長)を手がかりとして特定の時期に繁殖するが、日長をどのように測定しているのか、その分子機構は明らかになっていない。私たちは、長日繁殖動物であるメダカを材料として、日本各地に由来する系統について日長変化に対する応答を解析し、(1)繁殖開始に必要な日長(臨界日長)、(2)短日刺激に応答した繁殖の停止(短日応答)に地理的変異があることを見出した。本研究では、日長測時に関わる遺伝子を明らかにすることを目的として、これらの日長応答形質の変異に関する遺伝学的解析から原因染色体領域を特定した。

研究成果の概要(英文)：In seasonal reproduction, day length (photoperiod) is a cue to breed in the specific season for many animals, however, the molecular mechanisms of photoperiodic time measurement have not been clarified. Medaka, a small freshwater teleost, is a long-day breeder. We examined the response to changes of day lengths using various medaka populations collected from all over Japan, and found geographical variations in (1) a critical day length to induce reproduction and (2) response to short-day that induce reproductive quiescence. The present study aimed to identify the genes involved in the photoperiodic time measurement using these geographical variations. We conducted forward genetic approaches, and detected chromosomal regions involved in the response to day length.

研究分野：動物分子遺伝学

キーワード：光周性 季節繁殖 メダカ 卵巣 地理的変異

1. 研究開始当初の背景

温帯地域の生物を取り巻く環境は、季節に伴って大きく変動する。季節の変化を感知して行動や生理機能を変化させる生物の季節適応機構の理解は、基礎生物学的観点、また農水産業への応用や臨床医学的観点においても重要である。

生物が季節を感知する主要な手がかりとして日照時間(日長)の変化が知られており、日長に応じた生物の様々な応答は「光周性」と呼ばれる(Garner & Allard, 1920)。脊椎動物の光周性の分子基盤について、近年の鳥類や哺乳類、魚類を用いた機能ゲノミクスを駆使した解析から、日長情報の脳内情報伝達経路が明らかにされてきた(Yoshimura et al., 2003; Nakao et al., 2008; Nakane et al., 2010; 2013)。しかし、「日長を測定するしくみ」の解明は主要な問題として残されている。

日本に広く分布する小型淡水魚のメダカは、繁殖活動に明瞭な季節応答が認められる。Sawara & Egami (1977) は、生殖腺の発達に必要な日長は、沖縄よりも函館のメダカが長いことを示し、メダカの季節繁殖の臨界日長に変異がある可能性を指摘した。私たちは日長測定に関わる遺伝子に地理的変異があると考え、青森から沖縄まで緯度の異なる各地に由来するメダカを用いて、日照時間の長さで生殖腺発達の関係を解析した。その結果、繁殖における日長応答に地理的な変異が存在することを見出し、日長応答が異なる系統を利用した順遺伝学的解析を計画した。

2. 研究の目的

本研究では、魚類をモデルとした日長測時の分子機構を解明することを最終目的として、(1) 繁殖開始に必要な臨界日長の長さ(臨界日長)(図1)、(2) 短日で誘導される繁殖停止の応答性(短日応答)(図2)の表現型の違いに着目し、量的形質遺伝子座

(quantitative trait locus, QTL)解析、関連解析から染色体領域を明らかにし、遺伝子発現解析、候補遺伝子の機能解析により原因遺伝子の同定を目指した。

3. 研究の方法

(1) 臨界日長および短日応答の F2 世代を用いた QTL 解析

臨界日長: 明期「13.5 時間型」、「12.5 時間型」

である「舞鶴」と「宜野座」、「東通」と「花巻」の交配から、それぞれ F2 世代を作出した。冬の非繁殖期の F2 世代の雌を明期 13 時間条件に 3 週間暴露し、生殖腺を計量し GSI を算出した(表現型解析)。各 F2 について RAD-Seq (Restriction Site Associated DNA Sequence)法で一塩基多型 (SNPs)を同定し、GSI について量的形質遺伝子座 (QTL) 解析を行った。

短日応答: 「応答型」、「不応答型」である「清須」と「宮崎」、「舞鶴」と「宜野座」の交配から、それぞれ F2 世代を作出した。夏の繁殖期の F2 世代の雌を明期 10 時間条件(短日)に 2 週間暴露し、GSI を解析した(表現型解析)。RAD-Seq 法で SNPs を同定し、QTL 解析を行った。

実験遂行時のリスクを回避するため、それぞれの形質について 2 通りの系統の組み合わせから家系を作出して解析した。

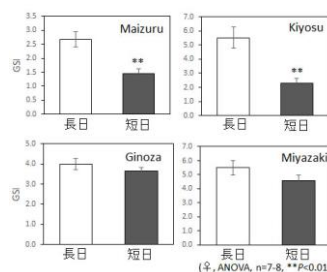


図 2. 各系統の雌の繁殖停止における短日応答。

(2) 短日応答に関する関連解析

① 短日不応答型を示す地域集団の検出

短日不応答型の分布域、系統をより詳細に明らかにして関連解析に適した系統を得ることを目的として、メダカバイオリソース (<http://www.shigen.nig.ac.jp/medaka/top/top.jsp>)で維持されている野生系統を譲り受けて子孫を得、短日に応答した生殖腺退縮を解析した。以前の解析と合わせ、19 系統について調べた。

② 九州集団を用いた短日応答の GWAS

QTL 解析で同定した染色体領域に着目し、不応答型である「宮崎」20 個体、応答型の「串間・西都・鹿島」合計 20 個体のゲノムシーケンスデータを利用して、PLINK1.07 による関連解析を行った。

(3) 短日応答の遺伝子発現解析

QTL 解析に用いた清須と宮崎の集団について、繁殖制御に重要な機能をもつ脳視床下部・下垂体領域のトランスクリプトーム解析 (RNA-seq)を行った。夏の繁殖条件にある雌各 5 個体を解析した。

4. 研究成果

(1) F2 世代の QTL 解析

臨界日長については、5 家系に由来する(舞鶴 X 宜野座)F2 雌 (n = 444)、5 家系に由来する(東通 X 舞鶴)F2 雌 (n = 167)について、Rad-seqにより同定したそれぞれ 649 SNPs、715 SNPs を利用して QTL 解析を行った結果、それぞれ 5 番染色体と 16 番染色体、14

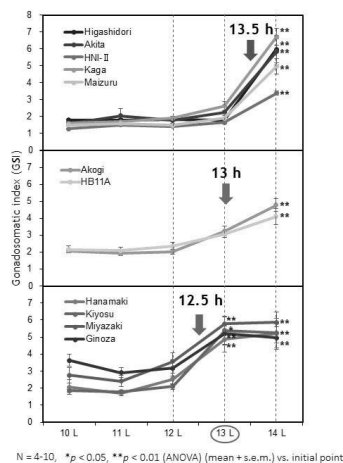


図 1. 各系統の雌の繁殖開始における日長応答。

番染色体に有意な QTLs を同定した(図 3)。

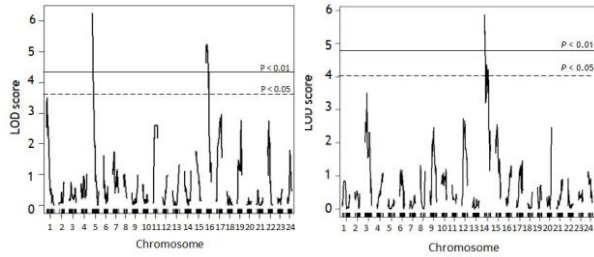


図 3. 繁殖開始における臨界日長の QTL 解析.
(舞鶴 X 宜野座) F2 (左)、(東通 X 花巻) F2 (右)。

また短日応答では、6 家系に由来する(清須 X 宮崎)F2 雌 (n = 245) について、395 SNPs を利用して、GSI 値が上位 10%、下位 10% に相当する各 25 個体の QTL 解析を行った。その結果、9 番染色体に有意な QTL を同定した(図 4 左)。5 家系に由来する(舞鶴 X 宜野座)F2 雌 (n = 126) では、1059 SNPs を利用して、GSI 値が上位 15%、下位 15% の各 20 個体の QTL 解析を行った結果、19 番、24 番染色体に QTL の存在が示唆された(図 4 右)。

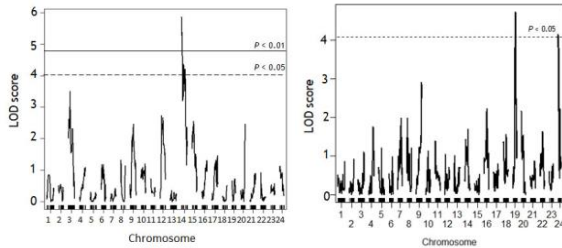


図 4. 繁殖停止における短日応答の QTL 解析.
(清須 X 宮崎) F2 (左)、(舞鶴 X 宜野座) F2 (右)。

(2) 短日応答に関する関連解析

① 短日不応答型を示す地域集団の検出

青森から沖縄まで、合計 19 系統について短日応答を解析した結果、沖縄県の 3 系統と、鹿児島県の大浦、宮崎県の宮崎の系統は短日不応答型であり、それ以外の系統は応答型であると判断された。九州地域に応答型と不応答型が混在していることが明らかになった。

② 短日応答の GWAS

短日応答の変異が混在していた九州地域のうち、分子系統解析から近縁関係にある系統を用いて(Takehana et al. 2003)関連解析を

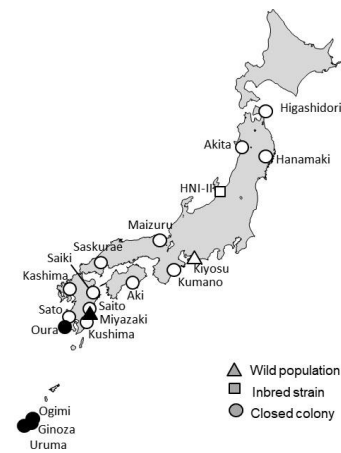


図 5. 各系統の雌の繁殖停止における短日応答。白が応答型、黒が不応答型。

行い、複数の関連領域を同定した。

(3) 夏の繁殖条件における脳視床下部・下垂体領域のトランスクリプトーム解析により「清須」「宮崎」間で発現に違いのある遺伝子を検出した。9 番染色体の QTL 領域に着目したところ、発現量に差異のある遺伝子をおよそ 30 検出した。

現在、QTL 領域にコードされる遺伝子について翻訳領域の SNPs 解析を進めている。さらに、本研究における遺伝子発現解析、関連解析の結果と合わせて候補遺伝子を検討するとともに、ゲノム編集による機能欠損個体の作出に着手している。今後、候補遺伝子の機能欠損が日長応答に影響を及ぼすかどうかを解析し、日長応答における役割を明らかにすることで、日長測定に関わる遺伝子を同定し、その働きを解明する。

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 2 件)

1. Shimmura T, Nakayama T, Shinomiya A, Yoshimura T. Seasonal changes in color perception. *General and Comparative Endocrinology* 260, 171-174 (2018) 査読無

doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.12.010

2. Shimmura T, Nakayama T, Shinomiya A, Fukamachi S., Yasugi M, Watanabe E, Shimo T, Senga T, Nishimura T, Tanaka M, Kamei Y, Naruse K, Yoshimura T. Dynamic plasticity in phototransduction regulates seasonal changes in color perception. *Nature Communications* 8, 412 (2017) 査読有

doi:10.1038/s41467-017-00432-8

[学会発表] (計 4 件)

1. 四宮 愛、他 「メダカの地理的変異を利用した短日性繁殖停止機構の遺伝学的解析」日本動物学会第 88 回大会、富山 (2017)

2. Shinomiya, et al. "Geographical variation and forward genetic approaches of photoperiodic time measurement in the teleost fish medaka" The joint meeting of the 22nd International Congress of Zoology (ICZ)/ the 87th meeting of the ZSJ (国際学会), Okinawa (2016)

3. 四宮 愛、他「メダカの日長応答の地理的変異を利用した日長測時機構の遺伝学的解析」第23回日本時間生物学学会学術大会、名古屋 (2016)
4. Shinomiya, et al. "Forward genetic analysis of photoperiodic time measurement in Medaka, *Oryzias latipes*" The 64th NIBB Conference “ Evolution of Seasonal Timers” (国際学会), Okazaki (2016)

[図書] (計 1 件)

1. Shinomiya A, Yoshimura T. Seasonal regulation of reproduction in vertebrates: special focus on avian strategy. In: Reproductive and Developmental Strategies: the Continuity of Life. Kobayashi K, Kitano T, Iwao Y, Kondo M eds., Springer (2018)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

四宮 愛 (SHINOMIYA, Ai)

基礎生物学研究所・季節生物学研究部門・特任助教

研究者番号：60452067