

令和 2 年 6 月 29 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K20983

研究課題名(和文)四色型色覚の形成機構解明に向けた錐体の分化・成熟機構の解析

研究課題名(英文)Development of tetrachromatic retinal cone subtypes in zebrafish

研究代表者

白木 知也(Shiraki, Tomoya)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・特任研究員

研究者番号：40632352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物の視覚は桿体と錐体という二種類の視細胞により光が受容されることにより始まる。明所視を担う錐体には波長(色)感受性の異なる複数のタイプが存在し、これらの組み合わせにより色覚は生み出されている。脊椎動物は進化の初期において四種類の錐体タイプを獲得し、四色型色覚をもっていたと考えられている。本研究では、四種類の錐体を保持するゼブラフィッシュを用いて、これまで解析の進んでいなかった青錐体と緑錐体の確立機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊椎動物は進化の初期において四種類の錐体タイプを獲得し、脊椎動物の祖先型は四色型色覚をもっていたと考えられている。しかし、分子レベルでの解析が進んでいるマウスは、このうち青から緑の中波長領域に吸収極大波長をもつ二つの光受容分子(オプシン)遺伝子を失っており、脊椎動物における四色型色覚の形成機構は未解明であった。本研究では、四種類の錐体を保持するゼブラフィッシュを用いて、青・緑錐体オプシン遺伝子の転写制御に関わる因子を同定し、四色型色覚の形成機構を明らかにした。今後、マウスや他の哺乳類、脊椎動物における解析結果との比較から、色覚形成機構の進化的変遷の解明にもつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Vertebrate vision begins with photoreception by two types of visual photoreceptor cells, rods and cones. Cones, which are responsible for photopic vision, are further subdivided into several subtypes with different wavelength (color) sensitivities, and the combination of these subtypes produces color vision. It has been thought that ancestral vertebrates acquired four cone subtypes and had tetrachromatic vision. In this study, using a zebrafish that retains four subtypes of cones, we have revealed the mechanism of establishment of blue and green cones.

研究分野：発生遺伝学

キーワード：視覚 色覚 錐体 ゼブラフィッシュ 網膜 光受容 発生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 緑錐体オプシン遺伝子 *rh2* の発現制御機構と青錐体の分化・成熟機構の解析

ヒトを含む脊椎動物は、幅広い光強度の環境に適した視覚機能を発揮するため、薄暗い環境で働く桿体と明所において機能する錐体という二種類の視細胞を保持している。多くの脊椎動物には波長感受性の異なる複数の錐体の光受容分子(オプシン)遺伝子が存在し、一般的には各錐体には一種類のオプシン遺伝子だけが相互排他的に発現している。このため波長感受性の異なる複数の錐体サブタイプが生まれ、これらの組み合わせにより色覚は形成される。多くの硬骨魚類や爬虫類・鳥類には四種の波長感受性の異なる錐体オプシン遺伝子 [UV 感受性 (*sws1*); 青色光感受性 (*sws2*); 緑色光感受性 (*rh2*); 赤色光感受性 (*lws*)] が存在し、四色型色覚をもつと推測される。円口類のフクロヤツメにおいて四種類の錐体オプシン遺伝子が存在することから、これら四種類の錐体オプシン遺伝子は脊椎動物の進化の初期において生じ、脊椎動物の祖先は元々、四色型色覚を保持していたと考えられる。一方で、ほとんどの哺乳類(真獣類)は青色光感受性 (*sws2*) と緑色光感受性 (*rh2*) の二つのオプシン遺伝子を失っているため、これらの転写制御機構は不明な点が多く、脊椎動物の色覚がどのように発達してきたのか理解が進んでいない。

この研究課題に迫るため、私たちは、昼行性で視細胞における錐体の比率が高く、かつ四種類の錐体オプシン遺伝子をもつモデル生物としてゼブラフィッシュに着目して研究を推進してきた。私たちはこれまでに、EGFPラベルした視細胞を蛍光を指標に分取してマイクロアレイ解析を行い、視細胞の中で錐体に特異的に発現する遺伝子を網羅的に同定した。さらに、新規の錐体特異的な転写因子が *sws2* や *rh2* の発現制御に関わるのではないかと考え、変異体を作製して解析を進めた。その結果、緑錐体オプシン *rh2* 遺伝子の発現に必要な転写因子として SIXファミリーに属するホメオボックス型転写因子 *six7* を同定した [Ogawa, Shiraki *et al. Proc. R. Soc. B* (2015)].

(2) ゼブラフィッシュにおける簡便な複数 sgRNA 発現方法の開発

CRISPR/Cas9システムの開発により、ゼブラフィッシュを含む様々な生物種において簡便かつ迅速にゲノム編集を行うことが可能となった。一方で、細胞の分化・成熟過程における遺伝子の機能を正確に評価するためには組織特異的あるいは時期特異的な遺伝子破壊が必要である。そのため、トランスジェニックフィッシュにおいてCas9遺伝子とsgRNAを発現させ、組織特異的に変異を導入する方法が開発されてきた。しかしながら従来の方法では、Cas9による二重鎖切断ののちに非相同末端結合により変異が作製されるため、その変異が必ずしも遺伝子の機能破壊を引き起こさないという問題が残されていた。

2. 研究の目的

(1) 緑錐体オプシン遺伝子 *rh2* の発現制御機構と青錐体の分化・成熟機構の解析

本研究課題では私たちのこれまでの研究成果をさらに発展させ、緑錐体オプシン遺伝子 *rh2* および青錐体オプシン遺伝子 *sws2* の転写制御機構を明らかにすることを旨とする。赤錐体オプシン遺伝子 *lws* の発現には *thrb* 遺伝子 [Suzuki *et al. PNAS* (2013)] が、UV 錐体オプシン遺伝子 *sws1* の発現には *tbx2b* 遺伝子 [Alvarez-Delfin *et al. PNAS* (2009)] が必要であることが先行研究から分かっている。これらの遺伝子に対するゼブラフィッシュ変異体の解析結果とあわせて、脊椎動物において四種類の錐体がどのような関係で分化・成熟しているのか理解したい。

(2) ゼブラフィッシュにおける簡便な複数 sgRNA 発現方法の開発

トランスジーン由来のCas9遺伝子とsgRNAによる遺伝子の破壊効率を上げるため、さらに複数の遺伝子を同時に破壊するため、複数のsgRNAを一つの転写産物から効率よく産生する手法をゼブラフィッシュにおいて開発することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 緑錐体オプシン遺伝子 *rh2* の発現制御機構と青錐体の分化・成熟機構の解析

緑錐体オプシン遺伝子 *rh2* の発現制御機構に迫るため、私たちがこれまでに同定した緑錐体オプシン遺伝子の発現に必要な転写因子 *Six7* の作用機序の解析を進めた。具体的には、*Six7*のゲノム上における結合サイトを網羅的に同定するためにクロマチン免疫沈降(ChIP-seq)解析を行なった。

青錐体の分化・成熟に関わる因子を同定するために、私たちが同定した錐体特異的な発現を示す転写因子に対する変異体の作製を進め、青錐体への分化・成熟に異常があるか否か解析を行った。

(2) ゼブラフィッシュにおける簡便な複数 sgRNA 発現方法の開発

イネにおいて開発された tRNA のプロセッシングにより複数の sgRNA を産生する手法をゼブラフィッシュに適用し、この手法がトランスジェニックゼブラフィッシュにおいても有効に機能するか評価を行った。

4. 研究成果

(1) 緑錐体オプシン遺伝子 *rh2* の発現制御機構と青錐体の分化・成熟機構の解析

FLAG タグで標識した *Six7* を視細胞に強制発現させたトランスジェニック系統を用いて、FLAG 抗体を用いて ChIP-seq 解析をおこなったところ、*Six7* が緑錐体オプシン遺伝子のごく近傍に結合することが分かった。このことは *Six7* が直接的に緑錐体オプシン遺伝子の転写制御を行うことを示唆していた。

一方で、*Six7* が青錐体オプシン遺伝子のごく近傍にも結合していたことから、*Six7* は緑錐体への分化・成熟だけでなく青錐体への分化・成熟にも関わることを示唆された。私たちは、錐体細胞に強く発現する分子として *six7* 遺伝子に加え、そのホモログである *six6* (*six6a*, *six6b*) 遺伝子も同時に同定していた。そこで、この両方の遺伝子を機能欠損する変異個体を作製したところ、青と緑の錐体オプシン遺伝子の発現がともに消失することが判明した。さらに *Six7* と同様に *Six6b* の ChIP-seq 解析を行ったところ、*Six6b* も青と緑のオプシン遺伝子のごく近傍に結合することが分かった。これらの結果から、*Six6* と *Six7* が青と緑のオプシン遺伝子の発現を協調的に制御することが明らかとなった。*six7* 遺伝子は硬骨魚類にしか保存されていないためにその機能の進化的保存性については不明であったが、今回の結果から他の脊椎動物では *six6* が同様の役割を果たす可能性が考えられた。

また興味深いことに、この *six7* と *six6* の三重変異個体は野生型と混在した通常の飼育環境下では成魚まで生育しないが、変異個体だけの飼育では成魚まで成長したことから、他個体との摂餌競争に勝てない可能性が想起された。そこで、幼生期の変異個体においてゾウリムシの捕獲行動を解析したところ、摂餌の成功回数が顕著に低下することが分かった。このことから青-緑色の波長領域の光受容が生存に重要な意味をもつことが明らかとなった。

一方、錐体細胞における遺伝子発現解析において *six6* と *six7* は四種類の錐体細胞に共通して発現していたため、青錐体もしくは緑錐体の分化・成熟に特異的に関わる転写因子の存在が予測されていた。私たちは 10 以上の錐体特異的な転写因子の変異体を作製して解析を行った結果、青錐体のオプシン遺伝子の発現のみが特異的に消失する変異体を同定することができた。さらに、この遺伝子は錐体の中でも青錐体特異的な発現を示しただけでなく、*six6a/b* と *six7* の三重変異体において発現が顕著に低下していたこと、および *Six7* と *Six6b* の ChIP-seq 解析においてこの遺伝子の近傍領域に *Six7* と *Six6b* が結合していたことから、この因子こそが *Six6* と *Six7* の下流で青錐体特異的に発現する転写因子であると考えられた。さらにルシフェラーゼアッセイから、この遺伝子は青錐体オプシン遺伝子のプロモーターを直接的に活性化することが示唆された。以上より、この遺伝子こそが青錐体への分化・成熟を規定する転写因子であると考えられた。一方で遺伝子発現解析から、UV 錐体の分化・成熟に関わる転写因子 *tbx2b* が UV 錐体と青錐体に特異的に発現することが分かっていた。この新規遺伝子の視細胞への強制発現によって UV 錐体オプシンの発現が低下していたことから、この因子は青錐体において UV 錐体オプシンの発現を抑制する機能も併せ持つことが分かった。以上の結果から、四種類に大別される脊椎動物の錐体細胞の分化・成熟を制御する転写コードの全貌が明らかになったと考えられる。

(2) ゼブラフィッシュにおける簡便な複数 sgRNA 発現方法の開発

複数の sgRNA と tRNA を連結した前駆体 RNA をゼブラフィッシュに導入した結果、tRNA 部分が前駆体 RNA から切り出される際に、複数の各々の sgRNA が産生されることを明らかにした。また私たちは実際に、ゼブラフィッシュのアルビノ遺伝子に対する 3 種類の sgRNA と tRNA を連結した前駆体 RNA、および Cas9 遺伝子を発現するトランスジェニック個体においてアルビノの表現型が観察されることを見出した。本手法を用いることにより、組織・時期特異的に複数の遺伝子を高効率で破壊することが可能になると考えられ、今後のゼブラフィッシュを用いた遺伝学研究的の推進につながると期待される。

< 引用文献 >

Tomoya Shiraki and Koichi Kawakami

A tRNA-based multiplex sgRNA expression system in zebrafish and its application to generation of transgenic albino fish

Scientific Reports, 8, 13366 (2018)

Yohey Ogawa, Tomoya Shiraki, Yoshimasa Asano, Akira Muto, Koichi Kawakami, Yutaka Suzuki,
Daisuke Kojima, Yoshitaka Fukada
Six6 and Six7 coordinately regulate expression of middle-wavelength opsins in zebrafish
Proceedings of the National Academy of Sciences, 116, 4651-4660 (2019)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ogawa Yohey, Shiraki Tomoya, Asano Yoshimasa, Muto Akira, Kawakami Koichi, Suzuki Yutaka, Kojima Daisuke, Fukada Yoshitaka	4. 巻 116
2. 論文標題 Six6 and Six7 coordinately regulate expression of middle-wavelength opsins in zebrafish	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 4651 ~ 4660
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1812884116	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 Shiraki Tomoya, Kawakami Koichi	4. 巻 8
2. 論文標題 A tRNA-based multiplex sgRNA expression system in zebrafish and its application to generation of transgenic albino fish	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13366
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-31476-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Tomoya Shiraki and Koichi Kawakami
2. 発表標題 A tRNA-based multiple sgRNA expression system toward the development of a simple and efficient conditional gene knockout method in zebrafish
3. 学会等名 14th International Zebrafish Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白木 知也、武藤 彩、川上 浩一
2. 発表標題 ゼブラフィッシュにおける網膜から視索前野への光入力経路の解析
3. 学会等名 日本動物学会第90回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tomoya Shiraki and Koichi Kawakami
2. 発表標題 A tRNA-based multiplex sgRNA expression system in zebrafish and its application to generation of transgenic albino fish
3. 学会等名 NIG International Symposium 2018 “Genome Editing and Functional Genomics” (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoya Shiraki and Koichi Kawakami
2. 発表標題 A tRNA-based multiplex sgRNA expression system in zebrafish and its application to generation of transgenic albino fish
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Tomoya Shiraki and Koichi Kawakami
2. 発表標題 Generation of albino-transgenic zebrafish using tRNA-based multiplexed sgRNA expression
3. 学会等名 第23回小型魚類研究会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 白木知也、川上浩一
2. 発表標題 アルビノ遺伝子組み換えゼブラフィッシュの作製
3. 学会等名 日本動物学会第88回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Tomoya Shiraki and Koichi Kawakami
2. 発表標題 Generation of transgenic-albino zebrafish using tRNA-based multiplexed sgRNA expression
3. 学会等名 International Workshop on Zebrafish Neural Circuits and Behavior (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 白木知也
2. 発表標題 視細胞の機能分化を生み出す転写制御機構の解析
3. 学会等名 第19回日本光生物学協会年会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

青や緑の色覚遺伝子を制御する分子の同定 https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2019/04/research-highlights_ja/rh20190410.html ゼブラフィッシュにおける簡便な複数sgRNA発現方法の開発 https://www.nig.ac.jp/nig/ja/2018/09/research-highlights_ja/20180907.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