

令和元年6月5日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K21352

研究課題名(和文) 遺伝性・季節変動性を示す消化管の長さを規定するDNA変異及びメチル化領域の探索

研究課題名(英文) Search for DNA mutations and methylated regions that regulated the length of the digestive tract that exhibit heritable and seasonal variability

研究代表者

勝村 啓史 (Katsumura, Takafumi)

岡山大学・自然科学研究科・特別研究員(PD)

研究者番号：10649544

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)：メダカの消化管の長さを規定するDNA変異と、可塑性を可能とするエピジェネティックな変化をゲノムワイドSNP解析とメチローム解析により見つけ出し、遺伝的多型と表現型可塑性によって表現型が多様化する分子・進化メカニズム解明の糸口をつかむことを目的として、研究を実施した。その結果、消化管の長さを遺伝的に規定する遺伝子領域と、消化管の可塑性に関連するDNAメチル化領域を見つけた。それらの分子進化学的解析より、季節変動するDNAメチル化領域の機能的消失が、消化管の長さを規定する変異の固定に重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果から、消化管の長さを規定する変異が存在すること、季節に応じてDNAメチル化を介して可塑的に変化させる可能性が高いことが示された。環境に応じた表現型の変化がこれら2つの仕組みによってどのように制御されているのか、本成果はこの問いに答えるための糸口を与えた。本研究成果は、“遺伝的同化”の分子メカニズムおよび、進化プロセスを捉えた可能性がある。今後も本研究を進めていくことで、メダカにおける消化管の長さの多様化が遺伝的同化によるものなのか検証可能で、進化学的にも本研究の意義は高い。

研究成果の概要(英文)：This study was carried out for the purpose of finding out DNA mutation which regulates the length of digestive tract of medaka and epigenetic change which enables the plasticity by genome wide SNP and methylome analysis, and grasping the beginning of elucidation of molecular and evolutionary mechanisms in which the phenotype diversifies by genetic polymorphism and phenotype plasticity. As the result, a gene region which genetically regulated the length of digestive tract and DNA methylation region concerning the plasticity of digestive tract were found. Molecular evolutionary analysis suggested that the functional loss of the DNA methylation region, which varies seasonally, is important for the fixation of mutations that regulate the length of the digestive tract.

研究分野：実験集団遺伝学

キーワード：表現型可塑性 遺伝的多型 メダカ エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

表現型は生息環境の影響を受け進化する。よって、表現型の多様化はゲノム上の変異に由来する遺伝的多型と、エピジェネティックな変化に伴う表現型可塑性の大きく2つの現象によって駆動されると考えられる。環境に応じて変化したと考えられるトゲウオの鱗板にも遺伝基盤が存在し、その原因アレルが選択圧に応じて変動した結果、表現型が時期に応じて変化したことが知られている (Barrett et al. 2008)。その一方で遺伝子型は同一であるが、環境に応じたエピジェネティックな変化により引き起こされる表現型可塑性も表現型の多様性をもたらす

(Johnson and Tricker 2010)。稀な例だが、表現型可塑性による表現型が次世代にも伝わることも知られている (Cooney et al. 2002)。それは表現型可塑性の遺伝と呼ばれ、進化に重要な現象と考えられている (表現型可塑性が進化をドライブするのか、またストップさせるのかは議論がある (Ghalambor et al. 2015))。このように、環境に応じた表現型の変化には、遺伝的多型と表現型可塑性の2つの現象の寄与が考えられるが、それら2つの現象がどのように関連し、表現型の多様化に寄与して来たかは不明な点が多い。

本研究で研究対象とするメダカの消化管は、研究者の間で経験的にその長さに地域差があることが知られていたが、それが遺伝的多型によって規定されているのか、またはエピジェネティックな変化による表現型可塑性なのか、そしてその表現型違いの進化的な意義は何なのかは不明であった。そこで私は、メダカの消化管の長さが遺伝的に規定されていること、そして環境に応じて変化することを明らかにし、現在、それを可能とした遺伝基盤・制御基盤の探索およびその進化プロセスを推定する為の基礎研究を行い、これまでに本研究計画を進めていく上で、以下の研究成果を得ていた。

- (1) 遺伝的に離れたメダカの地域集団間で消化管の長さが有意に異なる。
- (2) 交雑実験から、消化管長の長さの違いを決める遺伝基盤が存在する。
- (3) 遺伝的に近い野生集団間で、季節に応じて消化管の長さが異なる。

これらの結果は、消化管の長さを決める原因アレルが遺伝的多型として存在し、そのアレルの頻度が自然集団では季節変動していることを示唆する。しかしながら、消化管の長さに季節変動がみられた自然集団は、遺伝的には近縁な個体が集合した集団であり、エピジェネティックな制御の違いによって、消化管の長さの変化がもたらされた可能性も大いに残っていた。

2. 研究の目的

そこで、メダカの消化管の長さを規定する原因アレルと、可塑性を可能とするエピジェネティックな変化をゲノムワイド SNP 解析とメチローム解析により見つけ出し、遺伝的多型と表現型可塑性によって表現型が多様化する分子・進化メカニズム解明の糸口をつかむことを目的とした。そのために、遺伝的に規定された消化管の長さを示す管理環境下での野生メダカと、季節間で消化管の長さに変動がみられる自然環境下での野生メダカを用いて、ゲノムワイド SNP をベースとした関連解析による原因アレルの探索を、後者では夏と冬のサンプル比較により、季節変化する DNA メチル化領域の探索を行った。そして、消化管の長さを決める遺伝的多型な変化と、その表現型可塑性を規定するエピジェネティックな変化が、メダカ系統の中でどのように進化して来たのかを考察した。

3. 研究の方法

次世代シーケンサー (NGS) を用いたゲノムワイド SNP 解析とメチローム解析により、消化管の長さを決める原因アレルの探索と DNA メチル化に着目したメチル化領域の変化を調べた。そして、原因アレルと DNA メチル化領域の進化的解析を行い、進化プロセスを推定した。

4. 研究成果

原因候補アレルを同定するために、研究協力者と共に、新たな RAD-seq プロトコルを作成した。Amores らが発表した RAD-seq のプロトコル (Amores et al., 2011) をベースに、コストを抑えた RAD-seq の実験系を新たに考案した。本課題で立ち上げた RAD-seq 法を、東京大学で系統維持されている野生地域集団 (40 集団・計 341 個体) に適用し、関連解析を実施した。その結果、十分なデータが得られた 334 個体のメダカを比較して、約 60,000 SNPs を得た。それら SNPs をマーカーとして、関連解析を実施し、第 1 番染色体に統計学的に有意に関連するシグナルを検出した。さらに、RT-qPCR 法により、その SNP が存在する遺伝子の発現量は消化管の長さとは有意に関連することを見出した。

次に、季節変動する消化管の長さとは関連するメチル化 DNA 領域を特定するために、MBD-seq を行った。DNA メチル化領域を特異的に濃縮したライブラリをハイスループットシーケンサーに供し、季節に応じて DNA メチル化の程度が異なる領域を検出した。さらに、Reactome 解析と Gene Ontology 解析によって一つの遺伝子に絞られ、その遺伝子の発現量を RT-qPCR 法によって測定したところ、メチル化時、非メチル化時で有意に遺伝子発現量が異なることを見出した。その領域を特異的に欠失させたゲノム編集メダカを CRISPR/Cas9 法により作成し解析した。

最後に、RAD-seq により得られた約 60,000 SNPs を用いた GWAS を実施し、それによりみつかった関連遺伝子がメダカでどのように進化してきたかを、系統樹を用いて推定した。加えて、

季節変動する DNA メチル化領域の配列を用いて分子系統樹を作成し，その進化過程を推定した．その結果，季節変動する DNA メチル化領域の機能的消失が，消化管の長さを規定する変異の固定に重要であることが示唆された．

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

1. Medaka Population Genome Structure and Demographic History Described via Genotyping-by-Sequencing., Katsumura T, Oda S, Mitani H, Oota H, *G3* 9(1) 217-228 2019 (査読有り)
2. Abnormal nuclear morphology is independent of longevity in a *zmpste24*-deficient fish model of Hutchinson-Gilford progeria syndrome (HGPS). Tonoyama Y, Shinya M, Toyoda A, Kitano T, Oga A, Nishimaki T, Katsumura T, Oota H, Wan MT, Yip BWP, Helen MOL, Chisada S, Deguchi T, Au DWT, Naruse K, Kamei Y, Taniguchi Y, *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology : CBP*, 209 54-62 2018 (査読有り)
3. Experimental evidence reveals the UCP1 genotype changes the oxygen consumption attributed to non-shivering thermogenesis in humans. Nishimura T#, Katsumura T#, Motoi M, Oota H, Watanuki S (# These authors contributed equally to this work.), *Scientific reports* 7(1) 5570 2017 (査読有り)
4. An ancestral haplotype of the human PERIOD2 gene associates with reduced sensitivity to light-induced melatonin suppression. Akiyama T, Katsumura T, Nakagome S, Lee SI, Joh K, Soejima H, Fujimoto K, Kimura R, Ishida H, Hanihara T, Yasukouchi A, Satta Y, Higuchi S, Oota H, *PloS one* 12(6) e0178373 2017 (査読有り)
5. An Approach to Elucidate NBS1 Function in DNA Repair Using Frequent Nonsynonymous Polymorphism in Wild Medaka (*Oryzias latipes*) Populations. Igarashi K, Kobayashi J, Katsumura T, Urushihara Y, Hida K, Watanabe-Asaka T, Oota H, Oda S, Mitani H, *PloS one* 12(1) e0170006 2017 (査読有り)
6. A comparative study on the regulatory region of the PERIOD1 gene among diurnal/nocturnal primates. Katsumura T, Fukuyo Y, Kawamura S, Oota H, *Journal of Physiological Anthropology* (1) 21 2016 (査読有り)
7. In vivo 3D analysis of systemic effects after local heavy-ion beam irradiation in an animal model. Nagata K, Hashimoto C, Watanabe-Asaka T, Itoh K, Yasuda T, Ohta K, Oonishi H, Igarashi K, Suzuki M, Funayama T, Kobayashi Y, Nishimaki T, Katsumura T, Oota H, Ogawa M, Oga A, Ikemoto K, Itoh H, Kutsuna N, Oda S, Mitani H, *Scientific reports* 6 28691 2016 (査読有り)

〔学会発表〕(計 6 件)

1. 勝村啓史，メダカ消化管でみられる Plasticity-first evolution の分子メカニズムとその集団遺伝学的プロセス．第 124 回日本解剖学会総会全国学術集会，2019
2. Katsumura T，Loss of epigenetic modification sites drives plasticity-first evolution. 24th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 2018
3. Katsumura T，Molecular mechanisms and evolutionary processes underlying genetic assimilation in the digestive tract of medaka. Society for Molecular Biology & Evolution 2018, 2018
4. 勝村啓史，メダカ消化管長で観察される表現型可塑性とその進化．日本進化学会第 20 回大会，2018
5. 勝村啓史，野生メダカをモデルとした消化管長多型をもたらす進化メカニズムの解明，第 33 回日本霊長類学会大会，2017
6. 勝村啓史，野生メダカにみられる消化管長の季節変動に相関する DNA メチル化変動領域の網羅的な探索．第 122 回日本解剖学会総会全国学術集会，2017

〔図書〕(計 1 件)

1. ホルモンから見た生命現象と進化シリーズ III，成長・成熟・性決定 伊藤道彦，高橋明義（共編），勝村啓史，太田博樹（担当:共著，範囲:11．性的二型の分子進化学的理解ーメダカの尻鰭と性ステロイドホルモンー，pp156-173），裳華房，2016

〔産業財産権〕

出願状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

岡山大学プレスリリース:ゲノム解析から明らかになった日本列島メダカの 2 つの旅路

https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id582.html

日本のメダカの故郷はどこだ ゲノム解析で 2 カ所を解明

<https://www.asahi.com/articles/ASLD84HS3LD8PPZB009.html>

朝日新聞(岡山版, 紙面)に掲載, 「日本のメダカの故郷はどこだ ゲノム解析で 2 カ所を解明」,
2018 年 12 月 12 日

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8 桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：武島 弘彦，橋口 康之

ローマ字氏名：Hirohiko Takeshima, Yasuyuki Hashiguchi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。