

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05813

研究課題名(和文) ヒラメの有眼側特異的色素胞分化および無眼側の分化抑制を制御するメカニズムの解析

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of flounder metamorphosis regulating the pigment cell differentiation in ocular side and inhibiting it in blind side

研究代表者

横井 勇人 (Yokoi, Hayato)

東北大学・農学研究科・助教

研究者番号：40569729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒラメは水産上重要な魚種であるが、種苗生産で出現する体色異常が問題である。本研究は左右非対称に色素胞が分化する分子メカニズムを解析することを目的として行った。ヒラメの有眼側と無眼側で発現の異なる遺伝子を網羅的に単離し、色素胞分化に関与する遺伝子を単離した。これらの遺伝子は黒化異常個体において、黒化部位およびその辺縁部においても発現が観察され、異所的な色素胞分化にも関与することが示唆された。これら遺伝子の機能を解析するために、メダカを実験モデルとし、CRISPR/Cas9を用いたゲノム編集によりGFPをノックインしたシステムを作成し、遺伝子発現をライブ観察できる実験系を構築できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

天然水産資源の不安定化が続いており、持続可能な水産業の将来のためにも水産増養殖の重要性はますます高まっている。ヒラメは日本や周辺アジア諸国において重要な魚種であり、種苗生産および放流事業が行われているが、体色の異常は放流時の選別や放流後の生残率の点で、またその後の市場価値の点で問題である。本研究では色素異常を理解して低減に結びつけるため、色素胞の分化に関与する遺伝子を単離し、その解析を行った。黒化異常個体における異所的な発現が確認され、それを制御するメカニズムの理解が期待される。また遺伝子の機能解析を行うために、実験操作を行いやすいメダカをモデルとしてGFPノックインシステムを作出した。

研究成果の概要(英文)：Japanese flounder is one of the important fish species because of their commercial value, however, abnormal pigmentation is problematic in the aquaculture production. Aim of this study is to investigate the molecular mechanisms underlying the left/right asymmetric pigment cell differentiation. Genes involved in pigmentation were isolated by comparing gene expression profile of ocular side and blind side of flounder. Gene expression analysis using abnormal pigment fish with ectopic pigmentation revealed that these genes were expressed in such ectopic pigment sites and peripheries, which suggested that these genes also involved in ectopic pigmentation. In order to investigate the function of these genes, GFP-knock in strains were generated by using CRISPR/Cas9 genome editing system: gene expression can be monitored in live embryos with the GFP fluorescence.

研究分野：マリンゲノミクス、発生遺伝学

キーワード：ヒラメ 変態 異体類 色素胞分化 メダカ

1. 研究開始当初の背景

ヒラメやカレイなど異体類は、変態期に眼の移動と有眼側の色素胞分化により、左右非対称な成魚の体制へと移行する。異体類には、ヒラメやホシガレイなど市場価格が高く水産上重要な魚種が多く含まれており、種苗生産や放流事業が行われているが、人工飼育下では体色異常（有眼側の白化や無眼側の黒化）が発生して問題となっている。異常低減のために様々な試験研究が行われているが、抜本的な改善には至っていない。

2. 研究の目的

変態期に起こる左右非対称な色素胞分化の分子メカニズムを理解することにより、体色異常個体で起こっている現象を生物学的に解明すること：有眼側特異的な色素胞分化とともに、無眼側における色素胞の分化抑制に着目し、その分子メカニズムの解明を目的とした。

これまでに変態期ヒラメの遺伝子発現プロファイリングによって、左右非対称に発現する遺伝子を網羅的に単離してきた。本研究ではさらにブラジル産アルテミア（BA）給餌によって生じる白化異常（有眼側の白化）をモデルシステムとし、有眼側で色素胞分化が抑制されるメカニズムを、次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現プロファイリングにより解析することを計画した。有眼側における色素胞分化と無眼側における分化抑制の解析を通して、異体類の左右非対称な体色形成の分子メカニズムを明らかにするために実験を行なった。

3. 研究の方法

これまでに変態期ヒラメのトランスクリプトーム解析を行い、左右非対称に発現する遺伝子を網羅的に単離し、これらの中には色素胞分化に関与するものが多数含まれていた。本研究では、変態期前後および黒化異常個体における発現を解析し、色素胞分化および黒化異常における機能を解析した。

変態前の感受性時期に BA 給餌して白化異常を誘導し、UA 給餌個体を対照群として次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現プロファイルの解析、および遺伝子発現の変化を検出することを計画していたが、BA 給餌による白化誘導がはっきりとは確認できなかった。何度か検討したが、追認に至らなかった。

メダカは受精卵を得やすく胚が透明で、色素胞分化を解析するのに良いモデルである。ヒラメで単離した色素胞分化推進遺伝子および抑制遺伝子について、メダカの相同遺伝子を単離し、胚発生過程および変態期（受精後 1 ヶ月）における発現様式を解析した。また、CRISPR/Cas9 によるゲノム編集を応用して GFP をノックインした系統を作成し、レポーター遺伝子による発現解析を行った。

4. 研究成果

遺伝子発現プロファイルの比較により、変態後のヒラメの成体型色素胞分化過程に発現する遺伝子としていくつかの遺伝子が単離された。切片 *in situ* hybridization 法により、これらの遺伝子は有眼側特異的に発現することが確認された（右図の矢尻で示す：紫色がシグナル）。種苗生産で生じた黒化タイプの体色異常個体では、黒化部位およびその辺縁部において異所的に発現することが RT-PCR により確認された。



ヒラメでは実験的アプローチに限界があるため、実験モデル生物であるメダカおよびゼブラフィッシュを用いて機能解析を進めている。ヒラメで単離された色素胞分化に関与する遺伝子の相同遺伝子を単離して解析を行った。まず、実験モデルであるメダカやゼブラフィッシュにも相同遺伝子が存在し、遺伝子数も同じで1対1に対応することが分かった。発生過程における発現を調べたところ、一部の遺伝子についてゼブラフィッシュで発現が見られなかったことから、実験モデルとしてはメダカを使用することとした。CRISPR/Cas9によるゲノム編集により、相同遺伝子の制御領域に GFP をノックインした系統を作出した。GFP レポーターの蛍光は内在的な遺伝子発現を反映していたことから、遺伝子発現をライブ観察できる実験系が構築できた。掛け合わせでホモ個体を得ることにより、機能喪失型の表現型を観察し、この遺伝子の機能について解析を進める予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Chen Qiran, Yokoi Hayato, Suzuki Tohru	4. 巻 269
2. 論文標題 Expression profiles of RA synthases and catabolic enzymes in newly hatched and metamorphosing larvae of Japanese flounder, <i>Paralichthys olivaceus</i>	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 60 ~ 67
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ygcen.2018.08.015	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 Togawa Mai, Endo Yuna, Suzuki Nobuo, Yokoi Hayato, Suzuki Tohru	4. 巻 330
2. 論文標題 Identification of Sox10 positive cells at the dorsal fin base of juvenile flounder that are correlated with blind side skin ectopic pigmentation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution	6. 最初と最後の頁 427 ~ 437
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jez.b.22842	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 Iida Atsuo, Arai Hiroyuki N., Someya Yumiko, Inokuchi Mayu, Onuma Takeshi A., Yokoi Hayato, Suzuki Tohru, Hondo Eiichi, Sano Kaori	4. 巻 116
2. 論文標題 Mother-to-embryo vitellogenin transport in a viviparous teleost <i>Xenotoca eiseni</i>	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 22359 ~ 22365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1913012116	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 -
1. 著者名 Chen Qiran, Sato Kota, Yokoi Hayato, Suzuki Tohru	4. 巻 334
2. 論文標題 Developmental regulatory system of ocular side specific asymmetric pigmentation in flounder: Critical role of retinoic acid signaling	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution	6. 最初と最後の頁 156 ~ 167
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jez.b.22934	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 Iwaizumi Masaki、Yokoi Hayato、Suzuki Tohru	4. 巻 46
2. 論文標題 Plasmid delivery by electroporation into fish skeletal muscle for recombinant protein secretion and uptake by oocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Fish Physiology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1121 ~ 1130
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10695-020-00775-y	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 Miyake Minato、Sekine Michiharu、Suzuki Tohru、Yokoi Hayato	4. 巻 336
2. 論文標題 Visualization of Sox10 positive chromatoblasts by GFP fluorescence in flounder larvae and juveniles using electroporation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution	6. 最初と最後の頁 393 ~ 403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jez.b.23045	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 Iwaizumi Masaki、Yokoi Hayato、Suzuki Tohru	4. 巻 47
2. 論文標題 Delivery of exogenous proteins into eggs by injection into the mother's ovary (IMO) in zebrafish	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fish Physiology and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 849 ~ 855
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10695-021-00945-6	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 -

〔学会発表〕 計27件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 7件)

1. 発表者名 Shunya Nakamura, Satoshi Ansai, Kiyoshi Naruse, Tohru Suzuki, Hayato Yokoi
2. 発表標題 GFP-knock-in medaka revealed the involvement of dhfr-like and hdd in the xanthophore lineage pigment cell differentiation
3. 学会等名 53rd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists (JSDB) Co-sponsored by Asia-Pacific Developmental Biology Network (APDBN) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関根通陽, 鈴木徹, 横井勇人
2. 発表標題 エレクトロポレーション法によるヒラメ筋肉への遺伝子導入の条件検討と応用
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Qiran Chen, Kota Sato, Hayato Yokoi, Tohru Suzuki
2. 発表標題 Retinoic acid is the key regulator of asymmetric pigmentation in the Japanese flounder larvae
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 三宅みなと, 鈴木徹, 横井勇人
2. 発表標題 エレクトロポレーションを用いたヒラメ稚魚内の Sox10 陽性色素前駆細胞の in vivo での可視化
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤航大, 宇治督, 横井勇人, 鈴木徹
2. 発表標題 ササウシノシタ仔魚における Sox10 陽性 - 色素前駆細胞の分布とWntアンタゴニストの影響
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岩泉雅樹, 横井勇人, 宇治督, 鈴木徹
2. 発表標題 雌親魚の腹腔内注射による卵母細胞へのタンパク質の導入
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 齋藤雄大, 横井勇人, 宇治督, 鈴木徹
2. 発表標題 RNA-seqで明らかになった小型異体類、ササウシノシタの仔魚発生・変態期における遺伝子発現プロファイルの変化
3. 学会等名 日本動物学会 第90回 大阪大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 岩泉雅樹, 横井勇人, 鈴木徹
2. 発表標題 ゲノム編集による養殖有用系統作出の効率化に向けた技術展開研究
3. 学会等名 日本ゲノム編集学会 第4回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hayato Yokoi, Shunya Nakamura, Satoshi Ansai, Kiyoshi Naruse, Tohru Suzuki
2. 発表標題 dhfr and hdd, genes involved in pigment cell differentiation isolated by transcriptome analysis of flounder metamorphosis
3. 学会等名 52nd Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, Co-sponsored by APDBN (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 菊池美希、齋藤雄大、遠藤優女、陳其然、横井勇人、宇治督、鈴木徹
2. 発表標題 ササウシノシタ(<i>Heteromycteris japonica</i>)仔魚における鰭神経回路の発生と色素前駆細胞の局在
3. 学会等名 日本動物学会第89回札幌大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齋藤雄大、篠原怜、松田直往、田川正朋、横井勇人、鈴木徹
2. 発表標題 ヒラメの着色型黒化進行に伴う脳と皮膚のtranscriptomeの変化
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 陳其然、横井勇人、鈴木徹
2. 発表標題 RNA-Seq screening of up- and down-regulated genes by retinoic acid in metamorphosing flounder larvae
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村峻也、安齋賢、成瀬清、鈴木徹、横井勇人
2. 発表標題 色素胞分化に関与する新規遺伝子の解析
3. 学会等名 日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 横井勇人（分担執筆、編：平田普三）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 朝倉書店	5. 総ページ数 148
3. 書名 ゼブラフィッシュ実験ガイド	

〔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
研究 分担者	鈴木 徹 (Suzuki Tohru) (70344330)	東北大学・農学研究科・教授 (11301)	

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			
スペイン	国立海洋研究所	バルセロナ大学		
イタリア	トレント大学			