

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：12702

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06330

研究課題名(和文) 潮汐環境に適応進化した体内時計の分子基盤の解明

研究課題名(英文) Identification of circatidal clock genes in the mangrove cricket

研究代表者

佐藤 綾 (Sato, Aya)

総合研究大学院大学・先導科学研究科・連携研究員

研究者番号：60378560

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マングローブに生息するマングローブスズは、昼夜に対応した約24時間周期の概日リズムに加えて、潮の満ち引きに対応した約12.4時間周期の概潮汐リズムを示す。本研究は、マングローブスズがもつ概潮汐時計の分子基盤の解明を目的とした。初年度は、RNA-seq解析を行い発現量が概潮汐リズムを示す遺伝子を網羅的に探索した。次年度は、2つの候補遺伝子について、その発現量をRNA干渉法により抑制して概潮汐リズムへの影響を検証した。最終年度は、分子基盤解明の重要な情報となるゲノム配列の決定を行った。本研究で得られた研究成果は、概潮汐時計の分子基盤の今後の解明に大きく貢献すると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまでどの生物においても特定されていない概潮汐時計遺伝子を解明するため、恒常条件下で発現量が概潮汐リズムを示す遺伝子群を特定できた。また、分子基盤解明の重要な情報となるゲノム配列を高精度に決定することができた。これらの研究成果は、概潮汐時計の分子基盤の今後の解明に大きく貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：Mangrove crickets *Apteronomobius asahinai* are endemic to mangrove forest floors. They show circatidal rhythmicity with the period of 12.6 hours in their locomotor activity under constant condition. Little is known about the molecular mechanisms underlying the circatidal clock. To identify circatidal clock genes, we investigated rhythmic gene expression under constant darkness by RNA-seq. We identified higher number of transcripts with circatidal rhythmicity (284) than those with circadian (206). We also determined a high quality draft genome sequence of mangrove crickets. These dataset will facilitate further investigation of circatidal clock genes.

研究分野：時間生物学

キーワード：体内時計 概潮汐時計 時計遺伝子 マングローブ コオロギ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

多くの生物は、昼夜のサイクルに対応した約 24 時間周期の体内時計（概日時計）を持ち、活動に適した時刻を読み取る。概日時計の分子生理基盤の解明は進んでおり、複数の時計遺伝子による転写・翻訳フィードバック制御がリズムを刻むことが明らかになっている。

一方で野外には、一日の明暗以外にも、潮汐、月周、一年などさまざまな環境サイクルが存在する。干潟の生物にとって、潮汐サイクルへの適応は生存上重要となる。満潮と干潮は一日のうちに二回起こり、その周期は約 12.4 時間である。この潮汐サイクルに対応した約 12.4 時間周期の内因性の活動リズムを概潮汐リズムと言い、水生甲殻類などで報告されている。これらの生物は概潮汐時計を持つと考えられるが、その分子生理基盤の解明は進んでいないのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究では、分子生物学的手法（RNA-seq, RNAi 法, WGS-seq）を駆使し、マングロープスズがもつ概潮汐時計の発振に関わる遺伝子を特定することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 発現量が概潮汐サイクルを示す遺伝子の同定

野外から採集したマングロープスズを恒常条件下（暗黒・25℃）におき、3 時間ごとに 48 時間にわたってサンプルを採集して、各々トータル RNA を抽出して mRNA を選別し、相補的な配列をもった cDNA を合成して次世代シーケンサーを用いて配列を決定した（17 time-points の RNA-seq）。得られた配列から、転写産物の塩基配列を決定するとともに、各遺伝子の発現量を算出して周期分析を行った。

(2) 概潮汐時計の発振に関わる候補遺伝子の絞り込み

候補遺伝子と考えられた x-box binding protein1 遺伝子と S-adenosylmethionine synthase 遺伝子について、その発現量を RNA 干渉（RNAi）法で抑制して、概潮汐リズムに与える影響を調べた。RNAi 法では、候補遺伝子の二本鎖 RNA を作製し、氷冷麻酔した成虫の腹部に注入することで発現量を抑制した。コントロール群として、氷冷麻酔のみの実験群と細菌の持つ β -lactamase 遺伝子の二本鎖 RNA を注入した実験群を設けた。実験個体の歩行活動リズムを恒常条件下（暗黒・25℃）で計測して、周期を解析した。

(3) マングロープスズのゲノム配列の決定

精度の高いドラフトゲノム配列を決定するため、兄妹交配による近交系の作製を試みた。兄妹交配から得られた個体から抽出した DNA を超音波で断片化し、ライブラリーを作成して、次世代シーケンサーを用いて大規模に配列を決定した。

4. 研究成果

(1) 発現量が概潮汐サイクルを示す遺伝子の同定

17 time-points の RNA-seq を解析した結果、284 個の遺伝子の発現量が有意な概潮汐リズムを示し、206 個の遺伝子が有意な概日リズムを示した（図 1）。概潮汐振動を示した遺伝子のうち半数は NCBI の nr データベースに登録されている既知遺伝子と相同性が見られた。この中には、転写因子や DNA 結合ドメインをもつ遺伝子なども含まれ、概潮汐時計遺伝子の候補と考えられた。

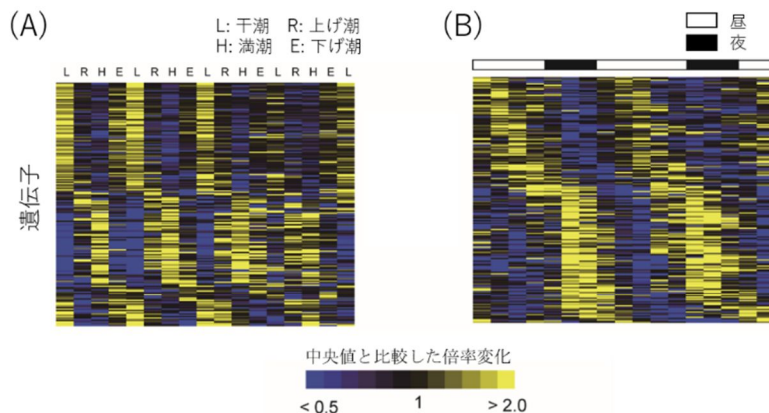


図1. 発現量が周期的に変化した遺伝子の発現プロファイル

発現量が概潮汐周期で変動した284個の遺伝子（A）と概日周期で変動した206個の遺伝子（B）について、3時間ごとの発現量（RPKM）の変化をヒートマップで示した。遺伝子ごとに発現量の中央値を求め、発現量を中央値で割った値を求め、中央値と比較した倍率変化（Fold change）で示す（中央値は1）。遺伝子は、発現量のピーク時刻の早い順に並べている。各ヒートマップの上部には、実験室内でサンプリング（3時間ごとに48時間）を行った時の野外における環境条件（A：潮汐サイクル、B：昼夜サイクル）を示す。

(2) 概潮汐時計の発振に関わる候補遺伝子の絞り込み

x-box binding protein1(Xbp1)遺伝子と S-adenosylmethionine synthase(Sams)遺伝子について、RNAi 法で発現量を抑制して恒常条件下での歩行活動リズムを記録・解析した結果、概潮汐リズムを示した個体の割合やその周期にコントロール群（氷冷麻酔のみ・*-lac* の二本鎖 RNA 注入群）と有意な違いが見られなかった（表1, 2）。これらの遺伝子のマングローブスズにおける役割は不明だが、概潮汐時計への関与は低いと考えられた。

表1. *Xbp1*遺伝子の発現量を抑制した結果

	<i>n</i>	概潮汐	概日	無リズム	周期*
氷冷麻酔のみ	8	4	2	2	12.68
ds <i>β-lac</i>	13	8	3	2	12.54
ds <i>Xbp1</i>	14	13	0	1	12.72

*周期は、概潮汐リズムを示した個体の平均値を示す。周期は3つのグループ間で有意な違いは見られなかった（ $p = 0.27$, Kruskal-Wallis rank sum test）。

表2. *Sams*遺伝子の発現量を抑制した結果

	<i>n</i>	概潮汐	概日	無リズム	周期*
氷冷麻酔のみ	8	7	1	0	12.75
ds <i>β-lac</i>	7	5	0	2	12.94
ds <i>Sams</i>	24	17	4	3	12.91

*周期は、概潮汐リズムを示した個体の平均値を示す。周期は3つのグループ間で有意な違いは見られなかった（ $p = 0.45$, Kruskal-Wallis rank sum test）。

(3) マングローブスズのゲノム配列の決定

精度の高いドラフトゲノム配列を決定するため、兄妹交配による近交系の作製を試みた結果、世代が進むにつれて十分な卵が採取できなくなり、8世代目で途切れてしまった。そこで8世代目の個体からDNAを抽出して、ドラフトゲノム配列の決定を行った。その結果、ゲノムサイズは約1.7Gbで、ゲノム精度の評価指標であるBUSCOスコア(complete)は93%と高い結果が得られた。タンパク質をコードする遺伝子は、34,634個決定され、そのうち61.5%のタンパク質は、既存のデータベースに登録された配列と一致した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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 Satoh Aya, Terai Yohey	4. 巻 9
2. 論文標題 Circatidal gene expression in the mangrove cricket <i>Apteronomobius asahinai</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-40197-2	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 佐藤綾	4. 巻 43
2. 論文標題 マングローブ林に見られる昆虫と潮汐に対応した体内時計	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 海洋と生物	6. 最初と最後の頁 19-25
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 佐藤綾, 寺井洋平, 高須美羽子
2. 発表標題 マングローブスズにおける概潮汐時計遺伝子の探索
3. 学会等名 第26回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Satoh Aya, Terai Yohey
2. 発表標題 Circatidal gene expression in the mangrove cricket <i>Apteronomobius asahinai</i> : searching for the circatidal clock genes
3. 学会等名 5th World Congress of Chronobiology (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔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	寺井 洋平 (Terai Yohey) (30432016)	総合研究大学院大学・先導科学研究科・助教 (12702)	

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
---------	---------