

令和 2 年 7 月 1 日現在

機関番号：18001

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14523

研究課題名(和文) 比較ゲノムクスから読み解く熱帯性魚類の月齢同調産卵制御機構

研究課題名(英文) Genomic approaches for understanding Lunar-phase dependent spawning in tropical groupers

研究代表者

竹内 悠記 (Takeuchi, Yuki)

琉球大学・理工学研究科・博士研究員

研究者番号：00754904

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)：月齢同調産卵魚は月の満ち欠けに応じた月光照射時間の周期的変化を情報源に月齢を認知すると考えられる。本研究は、異なる月齢で月齢同調産卵を行うマハタ属の近縁2種に着目し、両魚種の全ゲノム配列の比較と時計関連遺伝子の発現変化に月光が与える影響の比較から、月齢同調産卵が異なるタイミングで起きる原理の理解を目指した。本研究では、ヤイトハタおよびカンモンハタ両種のドラフトゲノム構築でき、今後の研究にも有効な情報基盤の整備を行うことができた。また、Cry遺伝子発現に着目した発現解析によって、新月に应答した下垂体におけるCry2の発現上昇が月齢同調産卵にとって重要なシグナルとなる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

種苗生産の現場では、水温や日長といった主に温帯域の魚が繁殖の同期に利用する環境要因を人為的に操作することで親魚の性成熟を制御し、種苗を得るタイミングの調整が行われている。ハタ類やアイゴ類といった熱帯域に起源を持ち、産業的価値の高い月齢同調産卵魚類の種苗生産は自然の月齢周期に従うか、化学物質に頼らざるを得ない。本研究において構築したドラフトゲノムは今後の月齢同調産卵魚類全般の産卵制御機構研究に加え、種苗生産技術開発の道を拓く基盤情報を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：It is assumed that lunar-synchronous spawner fish recognize their spawning lunar phase by detecting cyclic changes in intensity and duration of moon light irradiation. This study investigate two grouper species which have different spawning lunar phase and ask how they decide their spawning lunar phase. We succeeded to reconstruct draft genome of new moon spawner, Malabar grouper, and full moon spawner, Honeycomb grouper by hybrid assemble method which uses Illumina short reads and ONT minion long reads. Based on their genome sequence, several Cry genes were identified. Cry mRNA expression analysis revealed that Cry2 expression in the pituitary is suggested to be a possible internal mediator of moon light stimuli.

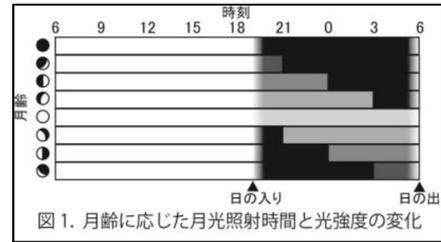
研究分野：魚類生理学

キーワード：月齢同調産卵 月周性 時計遺伝子 ハタ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

熱帯域を中心に温帯域まで南北に広く分布するハタ類やアイゴ類といった海産魚類は、それぞれの生息域の環境に適応した繁殖活動を行っている。この結果、同種であっても棲息地域によって異なる繁殖期を持つ。その一方で、こうした魚類の産卵周期には地理的な差が無く、種ごとに、ある特定の月齢において月1回の産卵を同調的に行う(月齢同調産卵) (Ikegami et al., 2014; 2015; Takemura et al., 2015)。月齢同調産卵魚類は、月の公転によって地球上で生じる環境変動を情報源として特定の月齢において同調的な産卵を行うと考えられるが、その詳細な生理機構についてはいまだ不明な点が多い。当研究グループは月の満ち欠けによって生じる「月光の照射時間と光強度の周期的変化(図1)」が月齢同調産卵を制御する主要な環境因子と考え、魚が月光情報を体内へ取り込む仕組みの解明に取り組んできた。熱帯から亜熱帯域に分布し、産卵期の間、上弦の月に一斉産卵することが知られているゴマアイゴを用いた研究では以下の成果を得た。



(1)ゴマアイゴは微弱な夜間光である月光の有無を検出する高感度の光感受能を有し、その情報をメラトニンの分泌量や時計関連遺伝子の発現変化といった内的因子に変換している。(Sugama et al., 2008, Kashiwagi et al., 2013; Park et al., 2014)

(2)時計関連遺伝子の一つである Cryptochrome3(*Cry3*)の間脳域における発現量は、1ヶ月周期の月周変動を示し、ゴマアイゴの体内で月齢状態を表現する因子となることが考えられた。(Fikushiro et al., 2012)

(3)間脳域における *Cry3* 発現の月周変動は、満月周辺の月光刺激によって1回限りの変動が生み出されている一過性のものと考えられた。こうした *Cry3* の一過性月周発現変動によって、ゴマアイゴの間脳域には満月周辺から翌月の上弦の月までの時間を1回だけ計測可能な砂時計型タイマーが形成されていることが考えられた。(Toda et al., 2014; Takeuchi et al., 2018)

種苗生産の現場では、水温や日長といった主に温帯域の魚が繁殖の同期に利用する環境要因を人為的に操作することで親魚の性成熟を制御し、種苗を得るタイミングの調整が行われている。その一方で、日本近海の海水温は地球温暖化に伴って上昇を続け、熱帯性魚類の分布も北進していることから、日本の水産業において月齢同調産卵を行うことが多い熱帯性魚類の水産的な重要度は今後高まっていくことが予想される。ハタ類やアイゴ類といった熱帯域に起源を持ち、産業的価値の高い月齢同調産卵魚類の種苗生産は自然の月齢周期に従うか、化学物質に頼らざるを得ないことから、月齢同調産卵魚全般の産卵制御機構の解明は重要な課題となっている。

### 2. 研究の目的

月齢同調産卵魚は種ごとに固有の産卵月齢を有するが、ゴマアイゴと異なる月齢で産卵する魚類においてもゴマアイゴ同様に砂時計型タイマーにより産卵月齢を認知するモデルが適応可能か調べられていない。また、近縁種間において産卵月齢の違いが生み出される仕組みも未だ不明である。本研究では、異なる月齢で産卵する近縁2種として、新月で一斉産卵するサイトハタ (*Epinephelus malabaricus*)および、満月で一斉産卵するカンモンハタ (*E. merra*)のマハタ属2種に着目し、時計関連遺伝子の発現変化に月光が与える影響の種間比較から、砂時計型タイマーを用いた産卵月齢認知モデルの一般性について検証する。さらに、両魚種のゲノム配列の比較から、月齢認知に関わる時間計測機構の普遍性と多様性を調べることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 新月産卵魚サイトハタおよび満月産卵魚カンモンハタの全ゲノムシーケンス

沖縄県栽培漁業センターより提供を受けたサイトハタ稚魚1匹および沖縄県瀬底島周辺において捕獲したカンモンハタ1匹より脳および肝臓を摘出し、それぞれから MagAttract HMW DNA Kit(Qiagen)を用いて高分子ゲノムDNAを抽出した。これらの一部を約500bpに断片化し Illumina HiSeq を用いた 150bp ペアエンドショートリードシーケンスを行った。得られたリードは FastP(Chen et al., 2018)もしくは Trimmomatic(Bolger et al., 2014)によるリードクリーニングを行った後、kmergenie(Chikhi and Medvedev, 2013)を用いた全ゲノムサイズの推定を行い、Platanus(Kajitani et al., 2014)を用いたアセンブルを行った。続いて、ショートリードシーケンスに用いたDNAと同じDNAを用いて Oxford Nanopore Minion によるロングリードシーケンスを行った。得られたリードは porechop(<https://github.com/rrwick/Porechop>)によるクリーニングの後に FMLRC(Wang et al., 2018)によってショートリードシーケンスを用いたシーケンスエラー修正を行い、Canu(Koren et al., 2017)を用いてアセンブルを行った。得られたショートリードアセンブリとロングリードアセンブリを DBG2OLC(Ye et al., 2016)と quickmerge(Mahul et al., 2016)に供することでハイブリッドアセンブリを作成した。さらに、NCBI Genome database に登録済みのハタ科魚類4種の全ゲノム配列を参照配列とした Medusa(Bosi et al., 2015)による scaffolding を行うことで、本研究対象のハタ科2魚種のドラフトゲノムを構築した。これらのドラフトゲノムは BUSCO(Seppy et al., 2019)および gVolante(Nishimura et al., 2017)を用いての完成度を評価した。

## 新月および満月産卵魚の時計関連遺伝子に着目したゲノム配列比較

ヤイトハタおよびカンモンハタのドラフトゲノムを用いて Blast データベースを作成し、硬骨魚類の時計関連遺伝子配列をクエリに両者のゲノムにコードされる時計関連遺伝子配列を取得した。それらの配列から推定されるアミノ酸配列と脊椎動物の時計関連タンパク質配列を用いて分子系統樹を作成し、両者のゲノムにコードされる時計関連遺伝子の同定を行った。その後、時計関連遺伝子の翻訳開始点から上流 5kb の転写調節領域における転写制御配列(E/E'box、D-box、RRE)の探索と2魚種間の比較を行った。

### (2) ヤイトハタにおける *Cry* 発現解析

ヤイトハタのゲノム配列情報を基に *Cry* cDNA 部分配列のクローニングを行った。得られた配列情報を基に qPCR プライマーを設計し、ヤイトハタの中枢および末梢組織における *Cry* 発現分布を調べた。また、最も日長が長くなる5月から6月にかけて新月、上弦の月、満月、下弦の月の4月齢における間脳および下垂体の *Cry* 発現日内変動をそれぞれ調べ、月齢間の発現パターンの違いを比較した。その後、月齢に応じた変化が認められた *Cry2* の間脳および下垂体における発現局在を In situ hybridization によって調べた。また、間脳および下垂体に加え、終脳における *Cry* 発現の月光応答性を調べるため、満月時における月光を月の出と同時に遮断した際の *Cry* 発現量の日内変動パターンを調べた。

### 新月および満月産卵魚の時計遺伝子発現比較

カンモンハタにおいてもヤイトハタ同様に日長増大期の自然光周期下において異なる月齢での *Cry* mRNA 発現の変動性を調べた。さらに、本研究対象魚種のヤイトハタおよびカンモンハタを実験暗室内において外界とおなじ光周期条件下で1ヶ月馴致飼育を行い、その後、魚を実験群と対照群の2群に分け、実験群には月光に近い波長スペクトルを示す微弱な人工月光ライトを暗期に照射する条件下で1ヶ月の継続した飼育を行い、飼育開始1カ月後から1週間おきに両者の脳内における *Cry* 発現の月周発現プロファイルを比較することを試みた。

## 4. 研究成果

### (1) 新月産卵魚ヤイトハタおよび満月産卵魚カンモンハタの全ゲノムシーケンス

Illumina HiSeq によるヤイトハタおよびカンモンハタゲノム DNA のショートリードシーケンスにおいて、リードクリーニング後、ともにペアエンド相塩基数約 100Gb の配列情報が取得できた。これらのリードを Kmergenie に供することで得られた推定ゲノムサイズはヤイトハタが約 1.03Gb、カンモンハタが約 0.89Gb であった。Oxford Nanopore Minion によるロングリードシーケンスでは両者ともに約 5Gb の配列情報を得た。Platanus および canu によるショートおよびロングリードそれぞれのアセンブルに加え、DBG2OLC と quickmerge を用いたハイブリッドアセンブルの結果、ヤイトハタでは 8977 本の contig(相塩基数約 1.25Gb、N50=631205)、カンモンハタにおいては 5299 本の contig(相塩基数約 0.92Gb、N50=714998)の De novo genome assembly が得られた。さらに、データベースに登録済みのハタ科魚類ゲノムシーケンスを参照配列とした Medusa による Scaffolding の結果、最終的にヤイトハタにおいて 2735scaffold (N50=1463806)、カンモンハタにおいて 1588scaffold(N50=1668259)のドラフトゲノムを得ることができた(表 1)。本シーケンスではロングリードにおいて低カバレレッジであったものの、BUSCO および gVolate を用いた完成度の評価においても良好な結果が得られたことから(図 2)、本研究で行ったアセンブル手法は低コストでドラフトゲノムを作成できる非常に有効な手法であるとかんがえられ、得られたドラフトゲノムは今後行われる遺伝子解析において重要な情報基盤になりうることを期待される。

表1 ヤイトハタおよびカンモンハタの全ゲノムDe novo assembly 結果

	Malabar grouper	Honeycomb grouper
Number of scaffold	2735	1588
Total bases (bp)	1241421973	923809143
N50 contig size (bp)	1463806.0	1668259

## 新月および満月産卵魚の時計関連遺伝子に着目したゲノム配列比較

ヤイトハタおよびカンモンハタのドラフトゲノムから時計関連遺伝子の探索を行った結果、Cryptochrome においては4種の *Cry* 遺伝子領域を特定できた(図 3)。これらのうち、*Cry2* において翻訳開始点から上流 5kb における時計遺伝子発現制御配列(E-Box, DBox)出現頻度に2種間で違いが認められ、ヤイトハタ *Cry2* 上流配列

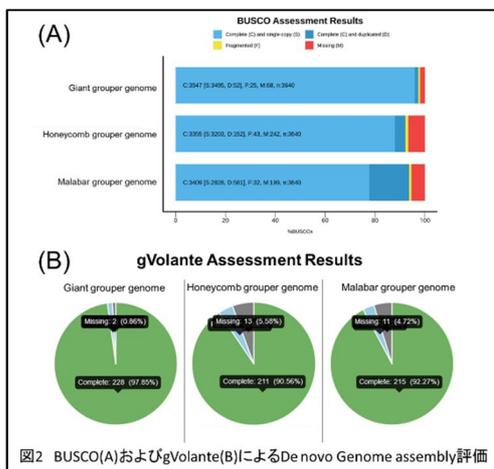
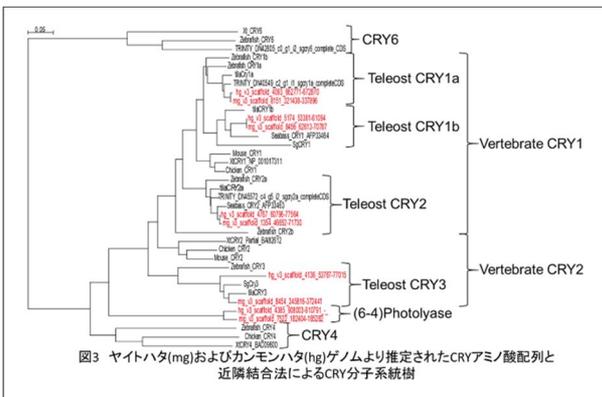


図2 BUSCO(A)およびgVolate(B)によるDe novo Genome assembly評価



では認められなかった E-Box がカンモンハタ *Cry2* では 2 つ出現した。本結果はハタ 2 種間における *Cry2* 発現制御において、E-Box に結合すると考えられる時計遺伝子産物のフィードバックの受け方が異なることを示唆する。

## (2) ヤイトハタにおける *Cry* 発現解析

ヤイトハタにおける *Cry* mRNA 組織発現分布を調べた結果、いずれの *Cry* においても中枢神経系で有意に高く発現することがわかった(図 4)。これらの間脳および下垂体における日周変動性および月周変動性を調べた結果、*Cry* 種において異なるパターンの日周変動を示す一方、*Cry2* mRNA が新月時に夕方に訪れる発現ピークが有意に高くなることが分かった(図 5)。満月から上弦の月に至るまでの 4 つの月齢における日の出後 6 時間後(ZT6)の間脳および下垂体における *Cry* 発現量を調べた結果においても、新月時における *Cry2* mRNA の顕著な発現上昇が観察された(図 6)。

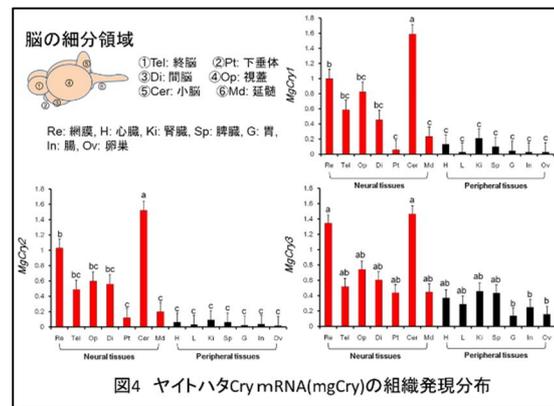


図4 ヤイトハタCry mRNA(mgCry)の組織発現分布

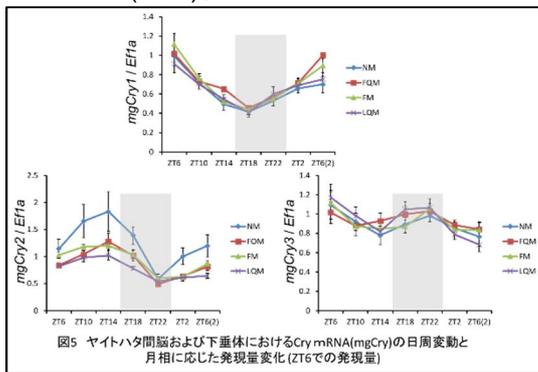


図5 ヤイトハタ間脳および下垂体におけるCry mRNA(mgCry)の日周変動と月相に応じた発現量変化(ZT6での発現量)

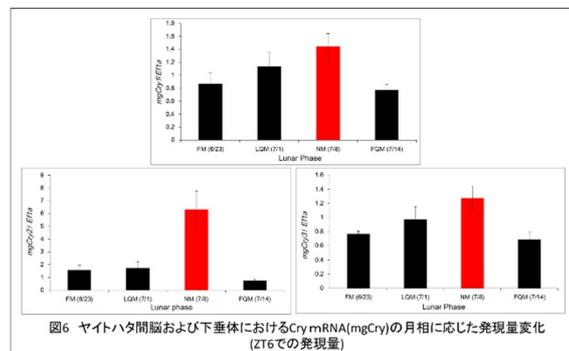


図6 ヤイトハタ間脳および下垂体におけるCry mRNA(mgCry)の月相に応じた発現量変化(ZT6での発現量)

間脳および下垂体における *Cry2* 発現局在を In situ hybridization によって組織学的に調べた結果、下垂体において強く発現していることが明らかとなったことから(図 7)、下垂体および間脳における *Cry2* の月光応答性について月光遮断条件下における発現プロファイルの取得からより詳細に検討した結果、下垂体においては調べた *Cry* いずれにおいても月光遮断条件下で発現が上昇することが明らかとなった(図 8)。これらの結果、月光情報は下垂体に伝えられ、生殖軸の制御を下垂体で行っていることが推察された。

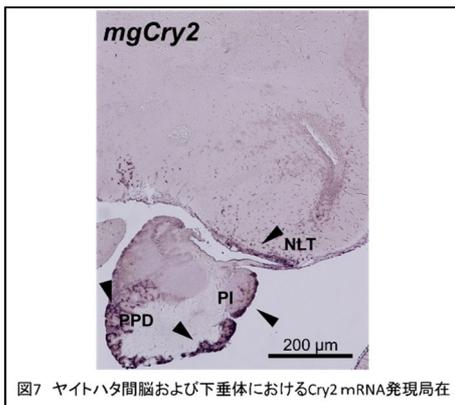


図7 ヤイトハタ間脳および下垂体におけるCry2 mRNA発現局在

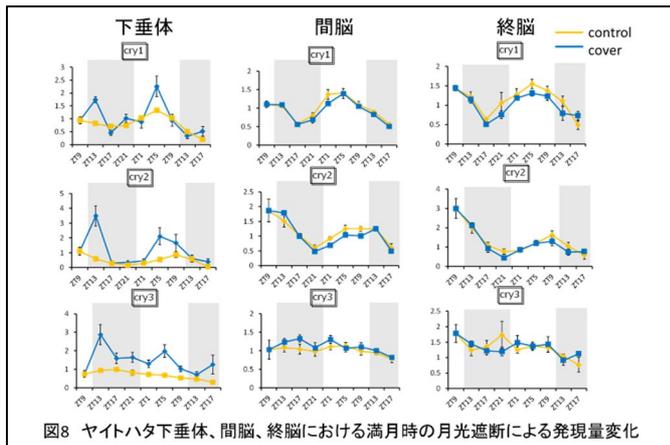


図8 ヤイトハタ下垂体、間脳、終脳における満月時の月光遮断による発現量変化

## 新月および満月産卵魚の時計遺伝子発現比較

自然光周期下で飼育したヤイトハタの間脳および下垂体における *Cry* mRNA 発現を新月、上弦の月、満月、下弦の月の 4 月相で調べた結果、*Cry2* mRNA 発現が新月において有意に上昇したことから、カンモンハタにおいても同様に間脳および下垂体における *Cry2* mRNA 発現を調べた結果、ヤイトハタと同様のパターンを示した。その一方で、ドラフトゲノム配列から *Cry2* 上流配列を調べた結果、両者の E-box 出現頻度が異なっていたことから、転写制御フィードバックに 2 種間での違いがあることが推測された。今後これらの上流配列を用いた Luciferase reporter assay によって時計関連タンパク質と転写制御の相互作用を調べていくことで、さらに月光応答性に関連した転写制御機構と産卵月齢を生み出す原理に対する理解が深まることが期待される。また、産卵月齢の違いを生み出す月光情報の利用法の差異について検討するため、人為光周期下において人工月光ライトを暗期に照射した際の、両者の間脳域における *Cry* 発現

の月周発現プロファイル比較することを試みたが、実験途中で魚が死亡し、これらの結果を2種間で比較に至らなかった。今後、本課題を解明するためには人為光周期下における長期飼育を可能にすることが必須であり、飼育条件の最適化を検討する必要があると考えられる。

#### 引用文献

- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170.
- Bosi E, Donati B, Galardini M, Brunetti S, Sagot MF, Lió P, Crescenzi P, Fani R, Fondi M. 2015. MeDuSa: a multi-draft based scaffold. *Bioinformatics*. 31(15):2443-51.
- Chikhi R., Medvedev P. Informed and Automated k-Mer Size Selection for Genome Assembly, HiTSeq 2013
- Fukushiro M, Takeuchi T, Takeuchi Y, Hur SP, Sugama N, Takemura A, Kubo Y, Okano K, Okano T. (2012) Lunar Phase-Dependent Expression of Cryptochrome and a Photoperiodic Mechanism for Lunar Phase-Recognition in a Reef Fish, Goldlined Spinefoot. *PLoS ONE* 6, e28643
- Ikegami T, Takeuchi Y, Hur SP, Takemura A. (2014) Impacts of moonlight on fish reproduction. *Marine Genomics* 14, 59-66
- Ikegami T, Takeuchi Y, Takemura A. (2015) Lunar clock in fish reproduction. In H. Numata, B. Helm (eds.), *Annual, Lunar, and Tidal Clocks*, Springer Japan, 163-178
- Kajitani R, Toshimoto K, Noguchi H, Toyoda A, Ogura Y, Okuno M, Yabana M, Harada M, Nagayasu E, Maruyama H, Kohara Y, Fujiyama A, Hayashi T, Itoh T. *Genome Res*. 2014. 24: 1384-1395
- Kashiwagi T, Park YJ, Park JG, Imamura S, Takeuchi Y, Hur SP, Takemura A. (2013) Moonlight affects mRNA abundance of arylalkylamine N-acetyltransferase in the retina of a lunar-synchronized spawner, the goldlined spinefoot. *Journal of Experimental Zoology Part A* 319, 505-516
- Koren S, Walenz BP, Berlin K, Miller JR, Bergman NH, Phillippy AM. 2017. Canu: scalable and accurate long-read assembly via adaptive k-mer weighting and repeat separation. *Genome Res*. 27(5):722-736.
- Mahul Chakraborty James G. Baldwin-Brown Anthony D. Long J. J. Emerson. 2016. Contiguous and accurate de novo assembly of metazoan genomes with modest long read coverage. *Nucleic Acids Research*, 44(19); e147
- Nishimura O, Hara Y, Kuraku S. 2017. gVolante for standardizing completeness assessment of genome and transcriptome assemblies. *Bioinformatics*. 33(22):3635-3637.
- Park YJ, Park JG, Takeuchi Y, Hur SP, Lee YD, Kim SJ, Takemura A. (2014) Influence of moonlight on mRNA expression patterns of melatonin receptor subtypes in the pineal organ of a tropical fish. *Marine Genomics* 14, 67-70
- Seppy M., Manni M., Zdobnov E.M. (2019) BUSCO: Assessing Genome Assembly and Annotation Completeness. In: Kollmar M. (eds) 2019. *Gene Prediction. Methods in Molecular Biology*, vol 1962.
- Shifu Chen, Yanqing Zhou, Yaru Chen, Jia Gu; fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor, *Bioinformatics*, Volume 34, Issue 17, 1 September 2018, Pages i884–i890
- Sugama N, Park JG, Park YJ, Takeuchi Y, Kim SJ, Takemura A. (2008) Moonlight affects nocturnal Period2 transcript levels in the pineal gland of the reef fish *Siganus guttatus*. *Journal of Pineal Research* 45, 133-141
- Takemura A, Takeuchi Y, Ikegami T, Hur SP, Soliman V, Ayson F, de Jesus-Ayson G, Sri Susilo E. (2015) Environmental control of annual reproductive cycle and spawning rhythmicity of spinefoots. *Kuroshio Science* 9, 31-38
- Takeuchi Y, Kabutomori R, Yamauchi C, Miyagi H, Takemura A, Okano K, Okano T. (2018) Moonlight controls lunar-phase-dependency and regular oscillation of clock gene expressions in a lunar-synchronized spawner fish, Goldlined spinefoot. *Sci Rep* 8, 6208
- Toda R, Okano K, Takeuchi Y, Yamauchi C, Fukushiro M, Takemura A, Okano T. (2014) Hypothalamic Expression and Moonlight-Independent Changes of Cry3 and Per4 Implicate Their Roles in Lunar Clock Oscillators of the Lunar-Responsive Goldlined Spinefoot. *PLoS ONE* 9, e109119
- Wang JR, Holt J, McMillan L, Jones CD. 2018. FMLRC: Hybrid long read error correction using an FM-index. *BMC Bioinformatics*. 19(1):50.
- Ye, C., Hill, C., Wu, S. et al. (2016) DBG2OLC: Efficient Assembly of Large Genomes Using Long Erroneous Reads of the Third Generation Sequencing Technologies. *Sci Rep* 6, 31900.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Fukunaga Kodai, Yamashina Fumika, Ohta Natsuki, Mizuno Hiromasa, Takeuchi Yuki, Yamauchi Chihiro, Takemura Akihiro	4. 巻 282
2. 論文標題 Involvement of melatonin in transducing moon-related signals into the reproductive network of the female honeycomb grouper <i>Epinephelus merra</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 113211 ~ 113211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113211">https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.113211</a>	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 Yamashina Fumika, Takeuchi Yuki, Fukunaga Kodai, Udagawa Shingo, Tan Ee Suan, Byun Junhwan, Yamauchi Chihiro, Takemura Akihiro	4. 巻 280
2. 論文標題 Daily expression of a clock gene in the brain and pituitary of the Malabar grouper ( <i>Epinephelus malabaricus</i> )	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 General and Comparative Endocrinology	6. 最初と最後の頁 9 ~ 14
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ygcen.2019.03.019	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 Takeuchi Yuki, Kabutomori Ryo, Yamauchi Chihiro, Miyagi Hitomi, Takemura Akihiro, Okano Keiko, Okano Toshiyuki	4. 巻 8
2. 論文標題 Moonlight controls lunar-phase-dependency and regular oscillation of clock gene expressions in a lunar-synchronized spawner fish, Goldlined spinefoot	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6208
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-018-24538-1	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0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----