

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 4 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06785

研究課題名(和文)硬骨魚類メダカの種内変異を利用した季節繁殖停止の制御機構の解明

研究課題名(英文)Studies on the regulation of the gonadal regression of seasonal breeding using intraspecific variation in the teleost fish medaka, *Oryzias latipes*

研究代表者

大竹 愛(四宮愛)(Shinomiya, Ai)

基礎生物学研究所・バイオリソース研究室・助教

研究者番号：60452067

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)：メダカは長日性季節繁殖動物であるが、我々は、低緯度地域由来のメダカ野生集団に、日長変化に対する応答が不明瞭な集団があることを明らかにしていた。本研究では、短日刺激「応答型」の清須と串間、および「不応答型」の宮崎の3系統の野生集団を用いて、次世代シーケンサーを利用した順遺伝学的解析から量的形質遺伝子座(QTLs)を3つの染色体領域に同定した。QTL領域の塩基配列の系統間比較、長日および短日条件下におけるトランスクリプトーム解析(RNA-Seq)から、日長変化に応じた生殖腺の退縮に関与する遺伝子を考察した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動植物の成長や繁殖に深く関わる季節適応の仕組みの解明は、基礎生物学的観点、また農水産業への応用の面からも重要である。多くの季節繁殖動物で、日長変化が繁殖期の引き金となることが知られているが、日長の感知とその下流で働く分子機構はまだ不明な点が多い。本研究で、メダカの日長変化への応答性の種内変異を利用して同定した、短日に応じた繁殖停止に関わる量的形質遺伝子座(QTLs)、短日応答時の遺伝子発現動態の変化は、季節繁殖停止の分子メカニズムの理解につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：Although the teleost medaka, *Oryzias latipes*, is known to be long-day breeder, we had previously shown that wild populations originating from low latitudes had genetically lower sensitivity to photoperiod. In this study, we used three wild populations including the short-day "responsive" Kiyosu and Kushima and "non-responsive" Miyazaki. Phenotypes of the F2 individuals in two types of crosses were examined, and three quantitative trait loci (QTLs) were identified on chromosomes 9, 6 and 20 by QTL analyses using whole genome sequences of the F2 generations. We compared the sequences of the QTL regions between "responsive" and "non-responsive" strains and performed transcriptome analyses (RNA-Seq) of Kiyosu and Miyazaki under long-day and short-day conditions, and discussed the genes involved in response to short-day and gonadal regression.

研究分野：遺伝学、生殖生物学

キーワード：光周性 季節繁殖 QTL解析 種内変異 メダカ

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

温帯地域では、季節に伴って自然環境が大きく変動するが、生物は季節を感知して行動や生理機能を変化させて適応している。動植物の成長や繁殖、疾患に関わる季節適応の仕組みの解明は、基礎生物学的観点、また農水産業への応用や臨床医学の面からも重要である。仔の生育に適した時期に出産するように特定の季節に繁殖する季節繁殖動物では、様々な環境因子の中で日長の変化が繁殖の引き金となることが知られている。近年の研究から、季節繁殖の開始に主要な役割をもつ甲状腺刺激ホルモンや 2 型脱ヨウ素酵素などの分子の働きが、脊椎動物で共通していることが明らかになってきた。しかし、日長変化を感知するしくみそのものには不明な点が多く、また季節繁殖停止（抑制）の分子機構に関する研究は進んでいなかった。

2. 研究の目的

これまでに私たちは日本各地に由来するメダカ野生集団の繁殖における日長応答性を解析した結果、低緯度地域に、短日刺激に応答した顕著な生殖腺退縮（短日応答）が起こらない、短日不応答型の集団が存在することを明らかにした。短日応答型である愛知県豊橋市（清須）と不応答型である宮崎県宮崎市（宮崎）の野生集団を用いた量的形質遺伝子座(QTL)解析から、短日刺激による繁殖停止に関わる QTL を検出していた。本研究では、(1) QTL 領域を絞り込むために、清須と宮崎の QTL 領域の詳細解析を行い、さらに分子系統学的に宮崎に近縁でありながら短日応答を示す串間（宮崎県串間市）と宮崎の QTL 解析を行った。また、現存する串間の自然野生集団を採集し、集団内の短日応答性の多型を解析した。(2) QTL 領域に位置する候補遺伝子の塩基配列を清須、宮崎、串間で比較し、候補遺伝子のアミノ酸配列の系統間多型を明らかにした。(3) 繁殖の制御に重要とされる脳視床下部、下垂体領域における日長変化に応じた遺伝子発現動態を明らかにするため、mRNA 発現量を網羅的に解析し、不応答型の宮崎と応答型の清須間で比較した。(4) 候補遺伝子についてその役割を解明するため、人為突然変異メダカを作成し、変異型の短日応答性を野生型と比較した。

3. 研究の方法

(1) これまでの清須と宮崎の QTL 解析では F₂ 世代雌 265 個体の短日応答（短日刺激による生殖腺退縮）解析と RAD-seq (Restriction Site Associated DNA Sequence) 解析が行われたが、複数の家系に由来する F₂ を用いたことから、全ての家系に共通した一塩基多型 (SNP) マーカーが十分に得られていなかった。短日刺激後の生殖腺サイズを GSI (生殖腺重量 × 100 / 体重) で評価した、F₂ 世代の上位および下位それぞれ 10% (各 25 個体) の全ゲノムシーケンスを行い、検出した SNP マーカーを用いて R/qtl により再解析を行った。

不応答型の宮崎と応答型の串間（宮崎県串間市）から短日刺激による生殖腺退縮を制御する遺伝子をマッピングするため、イネ等で報告されている QTL-seq 法 (Takagi et al. Plant J. 2013) を利用した。4 家系の F₂ 雌の短日応答解析から、1 家系を選抜した。GSI 上位および下位各 20% (各 28 個体) のバルク DNA を用いて、次世代シーケンサーにより全ゲノムシーケンスデータを取得し、CLC Genomics Workbench (ver. 21) で解析した。全ゲノムにおける SNP 頻度の群間差をスライディングウィンドウ解析し (1 Mb window, 50 kb step)、95% 信頼区間を計算して QTL を同定した。また、串間の自然野生集団を採集し、G₀、G₁ 世代の短日応答解析を行った。(2) 既に取得済みの清須、宮崎のゲノムシーケンスデータを参照して、実験 1 で得られた QTL 領域に存在する候補遺伝子の翻訳領域のアミノ酸配列を GENETYX (ver. 13) で解析し、系統間で比較した。

(3) 清須、宮崎の 2 系統の成熟した雌個体を用いて、長日及び短日の 2 条件、早朝および夕刻の 2 タイムポイントについて、脳下垂体、視床下部を含む脳領域の RNA-seq を行い、CLC Genomics Workbench (ver. 21) により発現量に系統差がある遺伝子を抽出した。

(4) CRISPR/Cas9 システムを用いて候補遺伝子に人為的に塩基欠失を誘導した機能欠損 (ノックアウト) メダカを作成して系統化し、繁殖期における短日応答性を調べた。

4. 研究成果

(1) 清須と宮崎の QTL 解析に用いた親 5 ペアのゲノム配列を参照し、系統に特異的な SNP を全ゲノム上 1-2 Mb の距離で選抜した。解析に用いた GSI 上位群および下位群各 25 個体の F₂ の遺伝子型結果から、分離に偏りのあるマーカーを除いて QTL 解析を行った結果、染色体 9 番に LOD 値 5.3 と 4.6 の 2 つのピークをもつおよそ 8 Mb の領域が 95% 信用区間として同定さ

れ、その範囲には 349 の遺伝子が位置していた。1%水準を超える LOD 値を示した範囲はおよそ 1 Mb であった (図 1)。

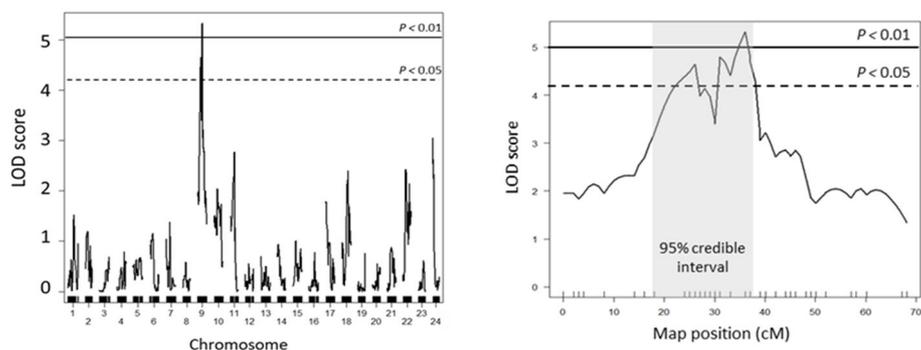


図 1. 清須と宮崎 F2 を用いた短日応答に関する QTL の LOD 値 (左: 全染色体、右: 染色体 9 番)

串間と宮崎の F₂、139 個体の上位群と下位群各 28 個体のバルク DNA をカバレッジ 35 で全ゲノムシーケンスを行い、系統特異的な 85 万 2 千以上の SNPs を検出して群間のアリル頻度を比較した (QTL-seq 解析)。その結果、6 番染色体と 20 番染色体に信頼区間 95% を超えるおよそ 2 Mb の領域を QTL として同定した (図 2)。清須と宮崎の遺伝解析で同定された QTL とは異なる染色体であることから、別の短日応答関連遺伝子の同定につながる事が期待される。

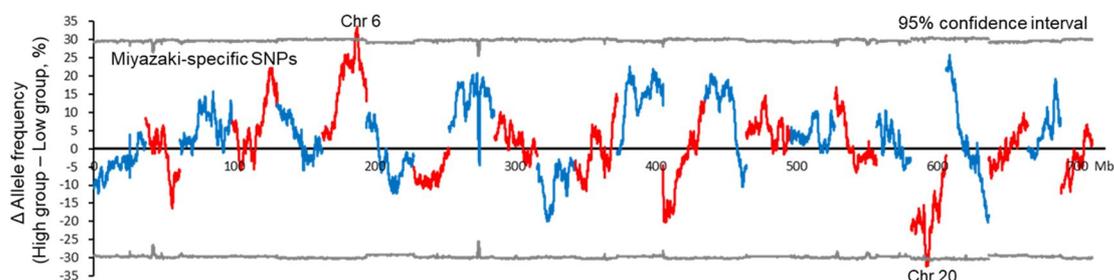


図 2. 串間と宮崎 F2 を用いた短日応答に関する QTL。左から右に染色体 1 から 24 番の結果を示す。

実験に用いた串間は、長年クローズドコロニーで維持されてきた集団であり、解析した全ての個体が短日応答型であった。自然集団における短日応答を確認するため、2020 年に串間野生集団を採集した。48 個体の短日応答を解析したところ、31% が短日不応答型であり、串間自然集団に短日応答の多型が現存していることが明らかとなった。さらに、串間 G₀ の集団交配から得た G₁ 雌に比べ短日不応答型の G₀ から得られた G₁ 雌は短日不応答型の割合が有意に高く (コクラン・アーミテージ検定, $p = 0.0101$)、短日不応答の形質が遺伝的であることが再確認された。この短日不応答型系統は継代しており、今後、原因遺伝子の同定に有用である。

(2) 日長に応じて生理機能を変化させる光周性には概日リズムが関与すると考えられている。清須と宮崎の QTL 領域に位置する遺伝子から、繁殖、概日リズムに関与することが報告されている 32 遺伝子について、SNPs から生じるアミノ酸置換を解析した。7 遺伝子について系統間の非同義置換を検出した。そのうち 2 遺伝子におけるアミノ酸置換は、PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer, v1.1) による解析からタンパク質の機能に影響を及ぼすことが予想された。

(3) 長日 (14 時間明記 10 時間暗期, 14L10D) および長日から短日 (10L14D) に移行後 2 週間の清須と宮崎について、照明点灯時 (ZT0) および点灯後 10 時間 (ZT10) において脳下垂体、視床下部を含む脳領域のトランスクリプトーム解析 (RNA-seq) を行った。主成分分析、クラスタリング解析から、遺伝子発現パターンは、同じ日長よりも、同じサンプリング時刻、さらに同じ系統でより類似度が高いことが示され (図 3)、同日長条件、同時刻の清須、宮崎の系統間で、それぞれ 793 から 1224 の遺伝子の発現量に系統差が認められた (fold change > 1.5, $p < 0.05$)。清須、宮崎の 9 番染色体の QTL 領域に位置する遺伝子のうち 27 が、短日条件において系統間の発現量に有意差が認められた。

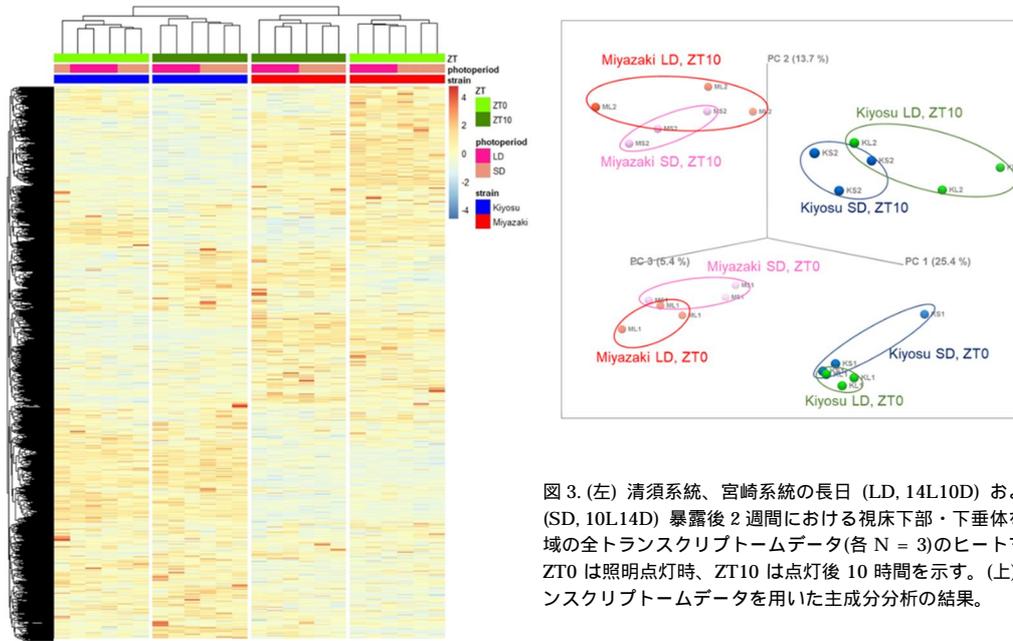


図 3. (左) 清須系統、宮崎系統の長日 (LD, 14L10D) および短日 (SD, 10L14D) 暴露後 2 週間における視床下部・下垂体を含む領域の全トランスクリプトームデータ (各 N = 3) のヒートマップ。ZT0 は照明点灯時、ZT10 は点灯後 10 時間を示す。(上) 全トランスクリプトームデータを用いた主成分分析の結果。

(4) 清須と宮崎の QTL 領域に位置し、系統間でアミノ酸置換が認められ、哺乳類で繁殖に関わる報告がある転写因をコードする遺伝子について、CRISPR/Cas9 システムを用いて第 1 エクソンに 20 塩基の欠失を誘導した人為突然変異個体を作成した。F₂ 世代において、突然変異ヘテロ個体、ホモ個体、野生型の短日応答を解析したところ、遺伝子型間で生殖腺退縮の程度に有意差は認められなかった。しかしながら、不安様行動を評価する Novel tank test において突然変異型個体の不安様行動は野生型個体に比べて有意に高く、この転写因子が冬期に特徴的な不安様行動に関係することが示唆された。他の候補遺伝子の突然変異個体を用いた機能解析は今後の課題である。

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 2件）

1. 著者名 Yassumoto TI, Nakatsukasa M, Nagano AJ, Yasugi M, Yoshimura T, Shinomiya A	4. 巻 e0234803
2. 論文標題 Genetic analysis of body weight in wild populations of medaka fish from different latitudes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 15(6)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0234803	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 Shinomiya A, Adachi D, Shimmura T, Tanikawa M, Hiramatsu N, Shigeho I, Naruse K, Sakaizumi M, Yoshimura T.	4. 巻 9(16)
2. 論文標題 Variation in responses to photoperiods and temperatures in Japanese medaka from different latitudes.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Zoological Letters	6. 最初と最後の頁 9(16)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40851-023-00215-8	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 四宮愛、Imaeda Yassumoto Tamiris、吉村崇
2. 発表標題 野生メダカを利用した短日による季節繁殖停止機構の遺伝学的解析
3. 学会等名 日本動物学会 第93回 早稲田大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 池田譲、伊藤祥輔、合田真、近藤滋、四宮愛、高橋明義、橋本寿史、廣部知久、福澤利彦、二橋美瑞子、二橋亮、持田浩治、森本元、吉岡伸也、若松一雅 著/秋山豊子 監修	4. 発行年 2022年
2. 出版社 グラフィック社	5. 総ページ数 322
3. 書名 「動物の体色がわかる図鑑 動物たちの色はこうして決まる」（担当「特集 動物が見る世界の彩」）	

〔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
研究協力者	(Imaeda Yassumoto Tamiris)		

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