

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15840

研究課題名（和文）日長応答性を示す機能未知遺伝子の機能解明

研究課題名（英文）Elucidation of the function of novel gene that shows photoperiodic responsiveness

研究代表者

中山 友哉（Nakayama, Tomoya）

名古屋大学・高等研究院（農）・特任助教

研究者番号：30866661

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）：日長の変化に応じて生物が生理機能や行動を変化させる現象は光周性と呼ばれている。この光周性の分子機構を明らかにすることを目的として、脳の時系列試料を用いた網羅的な遺伝子発現解析を実施したところ、明瞭な日長応答性を示す機能未知遺伝子（以降、遺伝子X）を新たに発見した。組織学的解析やシングルセル解析を実施したところ、遺伝子Xはよく知られているホルモン産生細胞とは異なる下垂体細胞で特異的に発現していることが明らかとなった。また、ゲノム編集技術を用いてノックアウトメダカを作成し、RNA-seq解析を実施したところ、433個の遺伝子が遺伝子Xによって制御されていることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光周性は、脊椎動物に限らず、昆虫や植物においても観察され、繁殖や渡り、開花など様々な生命現象において観察される。これらの事実は、光周性が進化上重要な性質であることを強く示唆しているが、光周性の分子機構は完全には明らかとなっていない。本研究では、先行研究において見出した機能未知な遺伝子に着目し、その解析を進めることで、遺伝子Xの特徴を明らかにすることができた。遺伝子Xは多くの脊椎動物で保存されているにも関わらず、その機能が明らかとなっていないため、今後、これらの知見をもとに研究を進めることで、遺伝子Xの機能の解明、さらには動物の季節適応機構の理解がさらに深まることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The phenomenon in which organisms change their physiological functions and behavior in response to changes in day length is known as photoperiodism. To elucidate the molecular mechanism of photoperiodism, we performed a comprehensive gene expression analysis using time series of brain samples and discovered a new gene of unknown function (hereafter referred to as "gene X") that exhibits a distinct photoperiod response. Histological and single-cell analyses revealed that gene X is specifically expressed in pituitary cells, which are distinct from the well-known hormone-producing cells. In addition, knockout medaka were generated using genome editing technology and RNA-seq analysis revealed that 433 genes are regulated by gene X.

研究分野：動物生理学

キーワード：季節適応 光周性 メダカ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

四季のある地域に生息する多くの動物は日長を季節の指標として季節の変化を読み取り、その季節に合わせた最適な生理機能や行動をとるよう進化してきた。この性質は光周性と呼ばれており、光周性を示す生命現象も多様である。近年の研究から季節繁殖の分子機構は理解が進んできたものの、その他の光周性を示す生理機能や行動の分子基盤は明らかとなっていない。我々はメダカをモデルとして脊椎動物の光周性の研究をしている中で、日長応答性を示す機能未知遺伝子（以降、遺伝子 X）を新たに発見した。遺伝子 X は、長日条件特異的に朝と夕方の 2 回ピークを示す 2 峰性の発現プロファイルを示し、14 時間以上の明期で 2 峰性の発現プロファイルが誘導されることが明らかとなっていた。つまり、遺伝子 X の発現制御には日長測定機構が存在することが示唆されている。また、脊椎動物に広く保存されており、いずれの動物においても機能が明らかとなっていなかった。

### 2. 研究の目的

このような背景の中で、遺伝子 X の機能やその発現制御機構を明らかにすることができれば、動物の季節適応機構の理解を前進できると着想した。そこで、本研究では分子生物学的手法を駆使することで遺伝子 X の機能やその発現制御機構を明らかにし、光周性の分子基盤や動物の季節適応機構を理解することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ゲノム編集技術を用いた遺伝子 X の機能解析

CRISPR/Cas9 システムを用いて遺伝子 X ノックアウト (KO) メダカを作製した。遺伝子 X の領域を挟むように 2 つの gRNA を設計し、1 細胞期胚に gRNA と Cas9 をマイクロインジェクションした。得られた G<sub>0</sub> 個体は野生型 (WT) と掛け合わせ、F<sub>1</sub> 個体を得た。遺伝子 X の遺伝子領域が欠失した個体を PCR により判定し、同一の欠失を有する F<sub>1</sub> 個体同士を掛け合わせた。得られた F<sub>2</sub> 個体は genotyping により、WT と KO を区別した。

ゲノム編集により作出した遺伝子 X KO メダカを用いて網羅的な遺伝子発現解析を実施した。短日条件もしくは長日条件にて飼育した WT あるいは KO メダカの視床下部および下垂体を採材し、その試料を用いた RNA-seq 解析を実施した。

#### (2) 下垂体を用いたシングルセルマルチオーム解析

先行研究において、遺伝子 X の発現部位を *in situ* hybridization により検討したところ、下垂体の一部の細胞で発現していることが明らかとなった。一方、どの細胞で発現しているか明らかではなかった。そこで、遺伝子 X が発現している細胞の特定と、長日条件で見られる 2 峰性の発現プロファイルの発現制御機構を明らかにすることを目的として、同一の細胞から遺伝子発現情報 (scRNA-seq) とクロマチン構造情報 (scATAC-seq) が取得できるシングルセルマルチオーム解析を実施した。なお、本データは、2022 年度の「先端ゲノム支援」による支援により取得した。

### 4. 研究成果

(1) 遺伝子 X は、日長によって発現が大きく変わることから、まず日長によって制御されている遺伝子を抽出した。短日条件と長日条件で飼育された野生型の RNA-seq データの解析を実施したところ、98 個の遺伝子が日長によって制御されていることが明らかとなった。次に、短日条件あるいは長日条件で飼育した野生型と KO の間で遺伝子発現解析を実施したところ、短日条件では 207 個の遺伝子が、長日条件では 262 個の遺伝子が WT と KO の間で発現が有意に変化していることが明らかとなった。そこで、これら 3 つの遺伝子リストを用いて共通項を抽出したところ、13 個の遺伝子が日長によって発現が変動し、遺伝子 X によって制御されていることが明らかとなった。今後は、RNA-seq 解析によって明らかとなった情報をもとに表現型解析を進めていく予定である。

(2) 長日条件で飼育したメダカの下垂体を用いてシングルセルマルチオーム解析を実施したところ、7,868 個の細胞の遺伝子発現情報、クロマチン構造情報を取得することができた。各細胞のトランスクリプトームの情報を元にクラスタリングした結果、18 個の細胞集団を同定することができた。次に、マーカー遺伝子の情報をもとに各細胞集団を同定した。その結果、FSH 産生細胞や LH 産生細胞、甲状腺刺激ホルモン産生細胞、プロラクチン産生細胞、コルチコトロピン産生細胞、成長ホルモン産生細胞、ソマトラクチン産生細胞など下垂体のホルモン産生細胞を同定することができた。次に、遺伝子 X が発現している細胞を検討したところ、上記のホルモン産生細胞とは異なる細胞集団で特異的に発現していることが明らかとなった。また、遺伝子 X+細胞集団は、光受容タンパクであるオプシンも発現していることが明らかとなったため、この細胞集団は光を直接感知できる可能性が示唆された。次に、同データを用いて遺伝子 X の発現制御機

構を明らかにすることを目的として、scRNA-seq データと scATAC-seq データの統合的な解析が可能な SCENIC+を用いた解析を実施した。その結果、遺伝子 X の発現制御に重要と考えられるシス制御配列や転写因子をいくつか同定することに成功した。現在、これらの転写因子のプロモーター解析の準備を進めている。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakayama Tomoya, Tanikawa Miki, Okushi Yuki, Itoh Thoma, Shimmura Tsuyoshi, Maruyama Michiyo, Yamaguchi Taiki, Matsumiya Akiko, Shinomiya Ai, Guh Ying-Jey, Chen Junfeng, Naruse Kiyoshi, Kudoh Hiroshi, Kondo Yohei, Naoki Honda, Aoki Kazuhiro, Nagano Atsushi J., Yoshimura Takashi	4. 巻 120
2. 論文標題 A transcriptional program underlying the circannual rhythms of gonadal development in medaka	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2313514120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2313514120	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 Nakayama Tomoya, Okubo Kataaki, Ansai Satoshi, Yoshimura Takashi	4. 巻 186
2. 論文標題 Identification and Characterization of Genes Involved in Vertebrate Photoperiodism	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Circadian Clocks (Neuromethods)	6. 最初と最後の頁 231 ~ 257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2577-4_11	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 Nakayama Tomoya, Okimura Kousuke, Shen Jiachen, Guh Ying-Jey, et al.	4. 巻 117
2. 論文標題 Seasonal changes in NRF2 antioxidant pathway regulates winter depression-like behavior	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 9594 ~ 9603
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2000278117	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 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中山友哉, 吉村崇
2. 発表標題 シングルセルマルチオミクスによる日長応答性を示す機能未知遺伝子の解析
3. 学会等名 2023年度「先進ゲノム支援」拡大班会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山友哉, 吉村崇
2. 発表標題 日長応答性を示す機能未知遺伝子の解析
3. 学会等名 生物リズム若手研究者の集い12023
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山友哉, 吉村崇
2. 発表標題 光周反応を示す機能未知遺伝子の発現制御機構の解析
3. 学会等名 日本睡眠学会第45回定期学術集会・第30回日本時間生物学会学術大会 合同大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山友哉
2. 発表標題 光情報の季節変化によって制御される動物の生理機能や行動の仕組み
3. 学会等名 日本動物学会 第94回山形大会 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中山友哉, 安齋賢, Romain Fontaine, Christiaan Henkel, 成瀬清, 吉村崇
2. 発表標題 光周反応を示す機能未知遺伝子の機能解析
3. 学会等名 第29回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山友哉
2. 発表標題 メダカから明らかとなった動物の季節適応戦略の分子基盤
3. 学会等名 生物リズム若手研究者の集い12022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山友哉
2. 発表標題 日長応答性を示す機能未知遺伝子の発現制御機構の解析
3. 学会等名 2022年度「先進ゲノム支援」拡大班会議
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomoya Nakayama, Satoshi Ansai, Kiyoshi Naruse, Takashi Yoshimura
2. 発表標題 Functional analysis of novel gene that shows photoperiodic responsiveness in medaka fish
3. 学会等名 第69回 日本生態学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中山友哉, 安齋賢, 成瀬清, 吉村崇
2. 発表標題 トランスクリプトーム解析より明らかになった光周性反応を示す機能未知遺伝子
3. 学会等名 令和4年度公益社団法人日本水産学会 春季大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

1年のリズムを刻む概年遺伝子を発見  
<https://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/ja/research/2023/12/post-67.php>  
冬季のうつ様行動を改善する薬を発見  
<http://www.itbm.nagoya-u.ac.jp/ja/research/2020/04/post-19.php>

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

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