

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：34506

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19280

研究課題名（和文）4色型色覚特異的マイクロRNAから探る色覚の制御と進化

研究課題名（英文）Tetrachromatic vision-specific miRNA: its role in evolution and regulation of color vision in vertebrates

研究代表者

日下部 岳広（Kusakabe, Takehiro）

甲南大学・理工学部・教授

研究者番号：40280862

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：4色型の色覚をもつ鳥類や魚類の網膜の錐体視細胞で特異的に発現するマイクロRNA（miR-726）について、脊椎動物ゲノムの網羅的な調査を行うとともに、miR-726変異メダカを作製し、変異メダカ系統と野生型系統の比較解析を行った。硬骨魚類、鳥類、爬虫類において、miR-726の喪失やシード配列の変異が、いくつかの分類群で独立に生じていること、それらが生態的な特徴と関連付けられる可能性を見出した。CRISPR/Cas9ゲノム編集法により欠損変異を含むmiR-726配列にさまざまな変異を導入したメダカ系統を得た。変異体において視覚に関わる様々な遺伝子の発現の変化が検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

色覚の進化過程においては、単にオプシン遺伝子の数や配列が変化するだけでなく、シグナル伝達系や遺伝子発現、細胞形質、細胞間ネットワーク、行動等、さまざまな変化が生じていると考えられる。miRNAは特定の生命現象に関連する多くの遺伝子の発現を同時に制御するため、本研究で見出された標的遺伝子が、他のアプローチではみつけることが困難な色覚関連遺伝子の発見につながることを期待される。また、本研究の成果に基づく解析を更に進めることで、4色型色覚をもつ陸上脊椎動物の共通祖先から哺乳類への進化の過程で失われた機能と、人類があらたに獲得した色覚の特性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）：We performed a comprehensive survey of vertebrate genomes for a microRNA (miR-726) specifically expressed in cone photoreceptor cells of the retina of birds and fish with tetrachromatic color vision. We found that mutations in the miR-726 sequence occurred independently in several lineages of fish, birds, and reptiles and that they could be associated with ecological characteristics. Various miR-726 mutants of medaka fish, including loss of function mutations, were generated by the CRISPR/Cas9 genome editing method, and comparative analysis between the mutants and wild-type strains was performed. Alterations in the expression of various genes involved in vision were detected in the mutants.

研究分野：発生生物学、神経生物学、進化生物学

キーワード：色覚 錐体視細胞 miRNA メダカ 進化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

鳥類や魚類の網膜には色センサー（錐体視細胞）が4種類あり、4色型の色覚をもつ。一方、多くの哺乳類は錐体視細胞を2種類以下しかもたない。ヒトを含む霊長類は、色弁別能が乏しい祖先から進化の過程で3種類の錐体視細胞による3色型の色覚を獲得した。研究代表者らは、メダカをモデルとして視細胞特異的な遺伝子発現制御機構の解析を行ってきた。その過程で、錐体オプシン遺伝子の近傍にマイクロRNA(miRNA)がコードされていることを見出した(図1)。miRNAはさまざまな細胞機能の制御に関わると考えられている分子量の小さい1本鎖RNA分子であり、相補的な配列をもつ遺伝子に対して抑制的に作用すると考えられている。研究代表者らは、miRNA遺伝子とオプシン遺伝子は共通のシス制御DNAによって、同じ錐体細胞で発現することを明らかにした(Dev. Biol. 392, 117-129, 2014)。推測されたmiRNAの標的には視細胞分化に関わる転写因子が含まれており、miRNAによる制御と転写制御のクロストークによるフィードバック機構が示唆された。これらのmiRNAの一つmiR-726は、魚類だけでなく、両生類、爬虫類、鳥類でも高度に保存されている(図2)。ところが、哺乳類とヘビ類はmiR-726をもたない。これらの動物の祖先は夜行性で、一般に色覚が失われている。また魚類のなかでも、青色センサーをもたない種ではmiR-726が失われていた。これらの結果からmiR-726は色覚に重要な役割をもち、その変化が色覚の消失に密接に関連していることが示唆された。

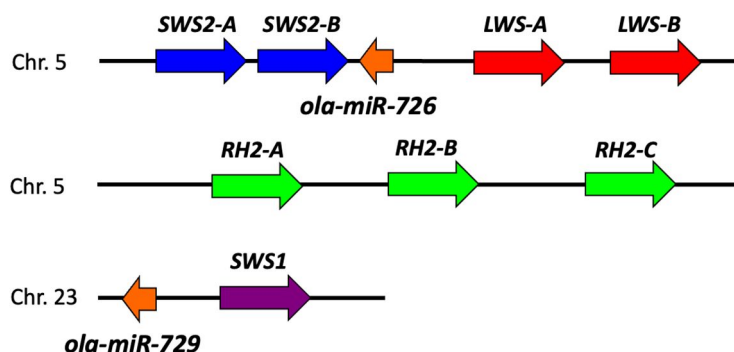


図1.メダカゲノムには8個の錐体オプシン遺伝子がある。これらの近傍に2つのmiRNA遺伝子を見出した(左向きの矢印)。

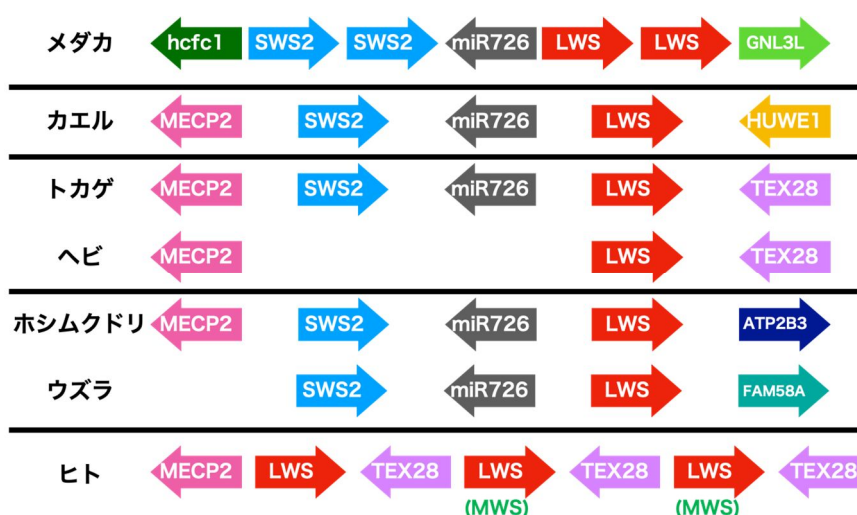


図2.さまざまな脊椎動物のmiR-726遺伝子座
青オプシン遺伝子(SWS2)と赤オプシン遺伝子(LWS)の遺伝子間領域にmiR-726がコードされている。ヘビと哺乳類にはmiR-726が存在しない。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者が見出した錐体視細胞で特異的に発現するmiRNA(miR-726)を手がかりとして、色覚の進化を探る。色覚に関する行動実験の手法が確立されているメダカを主に用いて、miR-726に欠損や変異を導入した個体の網膜の細胞構成、生理、行動等の解析により、miR-

726 の色覚とその進化における役割を明らかにする。

これまでの色覚の進化に関する研究はもっぱら、錐体オプシン遺伝子の重複や喪失と錐体オプシンのアミノ酸配列の変化による吸収スペクトルの変化に関するものであった。しかし、色覚の進化過程においては、単にオプシン遺伝子の数や配列が変化するだけでなく、シグナル伝達系や遺伝子発現、細胞形質、細胞間ネットワーク、行動等、さまざまな変化が生じていると考えられる。miRNA は特定の生命現象に関連する多くの遺伝子の発現を同時に制御するため、本研究により、他のアプローチではみつけることが困難な色覚関連遺伝子を同定し、進化過程で生じた変化が明らかになると期待される。

3. 研究の方法

(1) 脊椎動物ゲノムの網羅的な調査

ゲノム情報が利用可能な全脊椎動物種について miR-726 の有無、構造、発現を網羅的に解析する。miR-726 をもたない種、塩基配列が変化している種に関して、網膜構造や視細胞構成、色覚、生態との関連を調査する。得られた結果を近縁種を含めた系統樹上にマッピングし、miR-726 と色覚の進化との関連を考察する。

(2) 脊索動物における色覚進化の分子進化発生学解析

脊椎動物の姉妹群である尾索動物(ホヤ類)も含めた脊索動物における視細胞および光受容タンパク質(オプシン)ファミリーの多様性及び分子系統進化解析を行い、脊椎動物の色覚進化を理解するための基盤情報を得る。

(3) miR-726 変異個体のトランスクリプトームおよびプロテオーム解析

CRISPR-Cas9 法により miR-726 配列に変異を導入したメダカ系統を作製し、野生型メダカと miR-726 欠損メダカの網膜における遺伝子発現(トランスクリプトーム)とタンパク質(プロテオーム)を解析し、比較する。

(4) miR-726 変異と網膜形態および視覚の関連の解析

miR-726 に変異を導入したメダカ個体の網膜の細胞構成や組織形態を野生型網膜と比較し、行動実験により色覚機能を解析する。

4. 研究成果

(1) 脊椎動物ゲノムの網羅的な調査

脊椎動物全体に関してゲノム中の miR-726 の有無、構造、オプシン遺伝子など色覚に関わる遺伝子の構成等について網羅的な解析を行った。特に、生態、生理、形態の多様性が顕著な硬骨魚類に関しては、新たに公開されたゲノムも含め、広範かつ詳細な調査を行い、miR-726 の喪失やシード配列の変異が、いくつかの系統で独立に生じていること、それらが生態的な特徴と関連付けられる可能性があることを見出した。硬骨魚において miR-726 は高度に保存されているが、いくつかの系統で miR-726 を失っていた。またシード配列に変異をもつ種が見つかった。miR-726 の喪失は、赤オプシン遺伝子(LWS)または青オプシン遺伝子(SWS2)の喪失を伴うことが多く、LWS と SWS2 を失い、miR-726 のみが残存する事例はみられなかった。

(2) 脊索動物における色覚進化の分子進化発生学解析

カタウレイボヤにおいて、幼生の眼点視細胞の視物質オプシンとそのパラログの発現と機能について、波長感受性の違いと光環境や生活環との関係に関する新しい情報が得られた。さらにシングルセルトランスクリプトームに基づいて、視細胞を含む網膜を構成する細胞タイプの発生および進化的な関係性を推定した。

(3) miR-726 変異体の作製と解析

CRISPR/Cas9 ゲノム編集法により欠損変異を含む miR-726 配列にさまざまな変異を導入したメダカ系統を得た。また、miR-726 上流に存在するエンハンサー領域を欠失したメダカ系統を作製した。野生型メダカと miR-726 変異メダカ系統の網膜における遺伝子発現(トランスクリプトーム)と組織学的形態の比較解析を行った。トランスクリプトーム解析から、網膜における細胞分化や運命決定に関わる遺伝子群の発現の変化、マイクロ RNA の新しい転写後調節の可能性を示唆する結果が得られた。また、miR-726 欠損網膜において、明順応・暗順応に異常が生じている可能性を示唆する結果が得られた。マイクロ RNA は、直接的には転写ではなく転写後調節に作用すると考えられるため、野生型およびロドプシン遺伝子欠損メダカ網膜を用いて予備的なプロテオーム解析を行ない、網膜色素変性症の病態に似た興味深い表現型が得られた。miR-726 変異体メダカのプロテオーム解析は現在進行中である。また、行動解析を行うための実験装置を作製し、野生型メダカ、オプシン遺伝子欠損メダカ、miR-726 変異メダカを用いて視覚機能に関する

行動実験を行った。オブシン遺伝子欠損については明瞭な表現型が得られたが miR-726 変異と行動の明らかな相関を見出すことはできなかった。現在までのところ、行動実験はもっぱら視運動反応 (optomotor response) の解析にとどまっており、今後、より多面的な行動解析を行う必要がある。もうひとつの大きな問題点として、miR-726 の標的遺伝子がいまだに未解明な点が挙げられる。今後、生物種によっても miR-726 の標的遺伝子が変化している可能性も含めて、標的遺伝子の解析も平行して進める必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3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 2件）

1. 著者名 Matsuo Megumi, Matsuyama Makoto, Kobayashi Tomoe, Kanda Shinji, Ansai Satoshi, Kawakami Taichi, Hosokawa Erika, Daido Yutaka, Kusakabe Takehiro G., Naruse Kiyoshi, Fukamachi Shoji	4. 巻 63
2. 論文標題 Retinal Cone Mosaic in <i>sws1</i> -Mutant Medaka (<i>Oryzias latipes</i>), A Teleost	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Investigative Ophthalmology & Visual Science	6. 最初と最後の頁 21 ~ 21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1167/iovs.63.11.21	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 日下部 岳広	4. 巻 45
2. 論文標題 多様な動物を通してみた生きるしくみと進化 ~ ホヤとメダカで探る脳と眼の進化 ~	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 血液事業	6. 最初と最後の頁 789 ~ 791
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 -

1. 著者名 Zeng Xin, Gyoja Fuki, Cui Yang, Loza Matin, Kusakabe Takehiro G, Nakai Kenta	4. 巻 2023.12.03.569795
2. 論文標題 Comparative single-cell transcriptomic analysis reveals key differentiation drivers and potential origin of vertebrate retina	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2023.12.03.569795	査読の有無 無
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14件（うち招待講演 2件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林恵理佳, 日下尚美, 射場大貴, 大道裕, 岩崎了教, 池川雅哉, 日下部岳広
2. 発表標題 ロドプシン欠損メダカの網膜構造、行動およびプロテオーム解析
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林恵理佳, 福沢悠介, 川上泰治, 行者路, 大道裕, 横森類, 鈴木穰, 中井謙太, 日下部岳広
2. 発表標題 錐体視細胞特異的miRNA欠損メダカ網膜のトランスクリプトームおよび組織学的解析
3. 学会等名 Neuro2022 第45回日本神経科学大会 / 第65回日本神経化学会大会 / 第32回日本神経回路学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日下尚美, 大西雅也, 川上泰治, 行者路, 大道裕, 横森類, 鈴木穰, 中井謙太, 日下部岳広
2. 発表標題 長波長感受性錐体特異的エンハンサーのCRISPR/Cas9ゲノム編集法による機能解析
3. 学会等名 Neuro2022 第45回日本神経科学大会 / 第65回日本神経化学会大会 / 第32回日本神経回路学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日下部岳広
2. 発表標題 多様な動物を通してみた生きるしくみと進化 ~ホヤとメダカで探る脳と眼の進化~
3. 学会等名 第46回日本血液事業学会総会・特別講演5 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 日下部岳広
2. 発表標題 感覚器・神経系を中心とした脊索動物の発生・生理・進化に関する研究
3. 学会等名 日本動物学会第93回大会 日本動物学会賞受賞者講演 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福沢悠介, 日下尚美, 小林恵理佳, 大西雅也, 川上泰治, 横森類, 鈴木穰, 中井謙太, 行者路, 大道裕, 日下部岳広
2. 発表標題 メダカ長波長感受性錐体特異的エンハンサーLWS-CNR-Aの機能解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川上泰治, 小出美月, 横森類, 行者路, 鈴木穰, 中井謙太, 大道裕, 日下部岳広
2. 発表標題 UV錐体視細胞特異的miRNA (miR-729) 欠損メダカの網膜トランスクリプトームと視細胞モザイクパターンの解析
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林恵理佳, 日下尚美, 射場大貴, 福田ゆい, 大道裕, 岩崎了教, 池川雅哉, 日下部岳広
2. 発表標題 ロドプシン欠損メダカの網膜プロテオミクスと視運動反応
3. 学会等名 日本動物学会第94回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 日下尚美, 虻江貴裕, 福田ゆい, 川上泰治, 行者路, 大道裕, 横森類, 鈴木穰, 中井謙太, 日下部岳広
2. 発表標題 メダカ長波長感受性錐体視細胞特異的双方向エンハンサーの機能解析
3. 学会等名 日本動物学会第94回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名	Naomi Kusaka, Takahiro Abue, Yui Fukuda, Taichi Kawakami, Fuki Gyoja, Yutaka Daido, Rui Yokomori, Yutaka Suzuki, Kenta Nakai, Takehiro G. Kusakabe
2. 発表標題	Functional analysis of a long-wave sensitive (lws) cone-specific bi-directional enhancer in medaka
3. 学会等名	第56回日本発生生物学会大会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	Erika Kobayashi, Naomi Kusaka, Taiki Iba, Yui Fukuda, Yutaka Daido, Noriyuki Iwasaki, Masaya Ikegawa, Takehiro G. Kusakabe
2. 発表標題	A new fish model of retinitis pigmentosa: histological, behavioral, and proteomics analyses of medaka lacking rhodopsin
3. 学会等名	第56回日本発生生物学会大会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	小林恵理佳, 射場大貴, 福田ゆい, 大道裕, 岩崎了教, 池川雅哉, 日下部岳広
2. 発表標題	ロドプシン欠損メダカ網膜における桿体の喪失および短波長感受性錐体の増加と形態変化
3. 学会等名	第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名	行者路, 日下部岳広
2. 発表標題	ゲノムレベルでの網羅的解析が明らかにした脊椎動物進化過程における非視覚オプシンの複雑な欠失パターン
3. 学会等名	第23回光生物学協会年会
4. 発表年	2023年

1. 発表者名 小林恵理佳, 日下尚美, 射場大貴, 福田ゆい, 大道裕, 岩崎了教, 池川雅哉, 日下部岳広
2. 発表標題 ロドプシン欠損メダカの網膜プロテオーム・組織形態・行動
3. 学会等名 第23回光生物学協会年会
4. 発表年 2023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

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