

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月14日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780170

研究課題名（和文） 発生工学技術を利用した魚類変態機構の分子発生遺伝学的研究

研究課題名（英文） Molecular and developmental genetics of metamorphosis in fish

研究代表者

横井 勇人（YOKOI HAYATO）

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：40569729

研究成果の概要（和文）：本研究は種苗生産の高効率化のために魚類変態過程の基礎的知見を集積することを目的とし、モデル生物であるメダカを用いて分子発生遺伝学的な研究を行った。生体内の甲状腺ホルモンレベルを生きたままモニターするための GFP トランスジェニック系統の作出を行った。またメダカをモデルとして魚類の変態過程を解析するにあたり、甲状腺分化や甲状腺ホルモンシグナルに関与する約20の遺伝子についてメダカ胚における発現プロファイルを解析した。

研究成果の概要（英文）：This study aimed to accumulate the basic scientific knowledge on the metamorphosis in fish to help establishing more efficient production of the flounder aquaculture which has a huge economical impact in Japan. I conducted molecular and developmental genetic studies using medaka as a model. GFP transgenic lines were generated in order to monitor in vivo thyroid hormone level in a live fish. In another approach to establish medaka as a model system for studying metamorphosis, approximately 20 candidate marker genes that are implicated in thyroid gland development and/or thyroid hormone signaling were cloned and their embryonic expression patterns were examined.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：水産学・水産学一般

キーワード：変態、発生、小型魚類、モデル生物

1. 研究開始当初の背景

ヒラメ・カレイ類（異体類）では、変態期に左右非対称な色素細胞の分化と眼の移動が起こり、左右対称な仔魚から左右非対称

な成体へと移行する。我が国では異体類は重要な商業対象魚であるが、人工飼育下で色素異常や眼位の異常が起こることが問題となっている。変態に関連した異常は異体類に限

らず、骨奇形などを含めて養殖魚全般にあてはまる大きな問題の一つである。種苗生産現場の努力により、異常個体の出現率は改善しているものの、依然として根本的な解決には至っていない。

これまでに魚類の変態に関する研究が異体類を中心に活発に行われ、甲状腺ホルモンの制御によって変態が誘導されること、コルチゾルやレチノイン酸、プロラクチンなどが変態に影響を与えることが明らかにされてきた。変態の内分科学的な理解は深まっているが、変態期の組織変化の発生学的な知見は限られている。

研究代表者はこれまでメダカやゼブラフィッシュを研究対象として、遺伝子の過剰発現やトランスジェニックなどの発生工学手法を用いて魚類の発生過程における遺伝子機能の解析を行ってきた。メダカでは変態に関する研究はほとんど行われていないが、世代時間が短いため遺伝学的な解析が可能であり、ゲノム情報や突然変異体が整備されているなどの利点がある。異体類を中心としたこれまでの魚類変態機構の研究に、小型魚類の実験モデルとしての扱いやすさと発生工学手法を取り入れることにより、異体類では容易ではなかった遺伝学および実験発生学的側面から変態を研究することを着想した。

2. 研究の目的

本研究は実験モデル生物であるメダカを用いて、魚類における変態の分子基盤について基礎的知見を集積することを目的とし、将来的にヒラメやホシガレイなどの水産重要魚種の種苗生産現場に還元することを見据えて実験を行った。

3. 研究の方法

(1) メダカ変態関連マーカーの解析

メダカをモデルとして魚類の変態過程を解析するにあたり、メダカの変態に関する基礎的な知見の集積を行った。甲状腺分化を制御する因子、および甲状腺ホルモンの産生やシグナル伝達に参与する遺伝子を中心に約20の分子マーカーについてメダカホモログをクローニングし、メダカ胚および稚魚における発現の解析を行った。対象とした遺伝子は *dio1*, *dio2*, *dio3a*, *dio3b*, *hhx*, *nkx2.1a*, *nkx2.1b*, *pax2a*, *pax2b*, *thyroglobulin (tg)*, *thyroid hormone receptor alpha a (thraa)*, *thrab*, *thrb*, *thyroid stimulating hormone (tsh)* である。これらについて Digoxigenin (DIG) で標識したプローブを作製し、whole mount in situ hybridization 法により発現パターンを解析

した。また抗チロキシン抗体を用いて whole mount immunohistochemistry を行い、チロキシンの発現を解析した。

(2) 生体内の甲状腺ホルモンレベルを生きたままモニターするための GFP トランスジェニック系統の作出

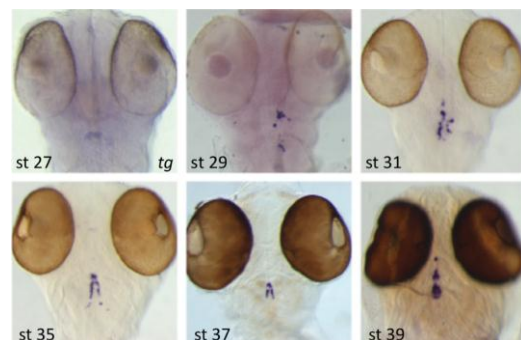
生体内の甲状腺ホルモンレベルを生きたままモニターする系を確立するために、甲状腺ホルモンの代謝に関わる *Deiodinase (Dio)* 遺伝子に着目し、この遺伝子のプロモーターで緑色蛍光タンパク質 GFP を発現させるトランスジェニック系統の作出を行った。メダカでは、真骨魚類の共通の祖先で起こったゲノム倍加により四肢動物の *Dio3* に対するオルソログが2つ存在する (*dio3a* と *dio3b*)。本研究では、両者について、ゲノムが公開されているメダカ、ゼブラフィッシュ、トゲウオ、トラフグ、ミドリフグからゲノム情報を抽出し、進化的フットプリント解析を行って重要な制御領域の候補を探索し、これらをクローニングして GFP および mCherry をレポーターとしたトランスジェニック用コンストラクトを作製した。これらはマイクロインジェクションにより、1細胞期のメダカ卵に導入した。

4. 研究成果

魚類の変態機構を理解するための研究モデルとして、メダカに着目して研究を行った。

(1) 甲状腺の正常発生

甲状腺ホルモンを産生する甲状腺の分化に参与する遺伝子の発現を指標としてメダカ胚における甲状腺の発生を観察した。甲状腺ホルモンの前駆体である *tg* 遺伝子の発現は st27 から甲状腺特異的に観察され、甲状腺の発生に伴って特異的な発現パターンを示した。発現は少なくとも孵化期 (st39) まで観察された。



メダカ胚における *tg* の発現。頭部腹側像。咽頭部に甲状腺原基が観察された。

抗チロキシン抗体による免疫染色では、st39 から甲状腺濾胞内においてシグナルが検出

された。*Pax2*は甲状腺の分化を制御することが知られているが、魚類には *pax2a* と *pax2b* が存在し、メダカでは *pax2a* の発現が st23 から st30 にかけて観察された。一方 *pax2b* は甲状腺では発現しておらず、メダカでは *Pax2*の甲状腺分化に関する機能は *pax2a* に分配されていることが示唆された。

(2) *dio3a_gfp* および *dio3b_gfp* トランスジェニック系統の作出

生体内の甲状腺ホルモンレベルを生きのままモニターできるトランスジェニック系統として、*dio3a* および *dio3b* 遺伝子の制御領域でコントロールされる GFP トランスジェニック系統を作出した。比較ゲノム解析のデータを参考にして、遺伝子のプロモーター領域のクロニングを行った。メダカよりもゲノムサイズが小さいトラフグのゲノムを使用し、10番染色体の *dio3a* について、260 bp の短いプロモーターと約 3 kb の長いプロモーターを、16番染色体の *dio3b* について、470 bp と約 2.3 kb のプロモーターをクロニングした。I-SceI メガヌクレアーゼベクターにサブクロニングし、1細胞期のメダカ卵に遺伝子導入した。F0世代の成長を待って、次世代への伝達を確認し、トランスジェニック系統として樹立したい。

メダカをモデル生物としてより使いやすくするための基礎的知見が集積された。今後、TILLING 法によるノックアウトにより、甲状腺ホルモンを産生できないメダカ突然変異体を利用して、変態における甲状腺ホルモンの機能をより詳細に解析する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. Itoh K, Washio Y, Fujinami Y, Shimizu D, Uji S, Yokoi H and Suzuki T. (2012). Continuous illumination through larval development suppresses dopamine synthesis in the suprachiasmatic nucleus, causing activation of α -MSH synthesis in the pituitary and abnormal metamorphic skin pigmentation in flounder. *Gen Comp Endocrinol.* 176(2):215-221. 査読有
DOI: 10.1016/j.ygcen.2012.01.017
2. Matsuda Y, Ito Y, Hashimoto H, Yokoi H and Suzuki T. (2011). Detection of vitellogenin incorporation into zebrafish oocytes by FITC fluorescence. *Reprod Biol Endocrinol.* 9:45. 査読有

DOI: 10.1186/1477-7827-9-45

3. Jovelin R, Yan YL, He X, Catchen J, Amores A, Canestro C, Yokoi H and Postlethwait JH. (2010). Evolution of developmental regulation in the vertebrate FgfD subfamily. *J Exp Zool B Mol Dev Evol.* 314(1):33-56. 査読有
DOI: 10.1002/jez.b.21307

[学会発表] (計12件)

1. 阿部雄二、鈴木徹、横井勇人
メダカにおける甲状腺関連マーカー遺伝子の発現による甲状腺正常発生の観察
日本水産学会春季大会、2012年3月27日、東京海洋大学
2. 横井勇人、近藤大地、藤浪祐一朗、宇治督、鈴木徹
ヒラメ仔魚で左右非対称に発現する遺伝子の単離の試み
日本水産学会春季大会、2012年3月27日、東京海洋大学
3. 伊藤香絵、鷲尾洋平、清水大輔、藤浪祐一郎、宇治督、横井勇人、鈴木徹
仔魚期の24時間照明飼育で起こる視床下部・下垂体経路の異常
日本水産学会春季大会、2012年3月27日、東京海洋大学
4. Tohru Suzuki, Nanako Watanabe, Hayato Yokoi
Circadian pacemaker in the suprachiasmatic nuclei of teleost fish revealed by rhythmic *per2* expression
International Symposium: Frontiers in Behavioral Brain Science ~Solving the mystery of sleep~, 2012年3月20日、東京国際フォーラム
5. 横井勇人
魚類におけるゲノム倍加と機能分配
アクアゲノム研究会、2011年10月1日、長崎大学
6. Hayato Yokoi, Daichi Kondo, Yuichiro Fujinami, Tohru Suzuki
A trial to dissect the flounder "hentai": isolation of genes expressed asymmetrically in left or right side in flounder
17th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, 2011年9月8日、東レ研修センター (三島市)

7. Hayato Yokoi, Daichi Kondo, Xiaoming Wu, Yuichiro Fujinami, Tohru Suzuki
Isolation of genes enriched asymmetrically in left or right side in flounder

44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 2011年5月20日、沖縄コンベンションセンター

8. Daichi Kondo, Yuichiro Fujinami, Susumu Uji, Hisashi Hashimoto, Hayato Yokoi, Tohru Suzuki

Left-sided expression of pitx2 at dorsal diencephalon and gut is maintained throughout larval development in flounders for metamorphic morphogenesis
44th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 2011年5月20日、沖縄コンベンションセンター

9. Hayato Yokoi, Yi-Lin Yan, Ayano Miyagi, Mark Currey, Julian Catchen, William Cresko, Tohru Suzuki, John Postlethwait
Evolution of soxE genes in teleost fish revealed by comparative expression analysis and genomics.

43rd Annual Meeting for the Japanese Society of Developmental Biologists, 2010年6月21日、京都国際会館

[図書] (計1件)

1. Yokoi H and Postlethwait JH. (2011). Genome duplication and subfunction partitioning: Sox9 in medaka and other vertebrates. In “Medaka: Model for Organogenesis, Human Disease and Evolution.” Editors: Takeda H, Naruse K, Tanaka M. Springer. pp323-337. (book section).

ISBN: 978-4-431-92690-0

[その他]

ホームページ等

東北大学研究者紹介

<http://db.tohoku.ac.jp/whois/detail/0b42e27653b7f35e08dfd12bc8aceb84.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横井 勇人 (YOKOI HAYATO)

東北大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号: 40569729