

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 16 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380113

研究課題名(和文) 魚類の温度適応に関わる分子ネットワークの探索

研究課題名(英文) Research on the molecular network implicated in the temperature acclimation of fish

研究代表者

渡部 終五 (Shugo, Watabe)

北里大学・海洋生命科学部・教授

研究者番号：40111489

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：魚類の温度適応に関わる分子ネットワークの探索を目的に、メダカを24℃で馴致した後、10℃および30℃の水槽に移し、30日以上飼育(馴化)した。変化前、変化直後、馴化後のメダカより筋肉および脳を採取し、全RNA抽出およびmRNA精製を行った。次世代シーケンサを用いた転写産物の網羅的解析を行った結果、10℃および30℃馴化メダカ間で筋肉および脳において、それぞれ31および20遺伝子に馴化温度依存的な発現変動が認められた。筋組織で発現変動がみられた31遺伝子中、熱ショックタンパク質およびE3ユビキチンリガーゼ遺伝子などは温度変化直後から発現量が変化していた。

研究成果の概要(英文)：Medaka was employed to investigate the molecular network implicated in the temperature acclimation of fish. The fish were introduced into the aquarium at 24℃, and water temperature was shifted to either 10 or 30℃ within 1 day and subsequently maintained for a minimum of 30 days. Total RNAs were prepared from the fast skeletal muscles and brains of the fish acclimated and those before and just after the temperature shift. Global gene expression analysis was carried out using next generation sequencing to notify differentially expressed genes between 10- and 30℃-acclimated fish. Differentially expressed were 31 and 20 genes in the muscle and brain tissues, respectively, between the two acclimated groups. Among 31 genes in the muscle, the expression levels of those encoding heat shock protein and E3 ubiquitin ligase were found to be changed even in the fish just after the temperature shift.

研究分野：水産化学

キーワード：温度馴化 ミオシン 分子ネットワーク 転写産物 次世代シーケンサ メダカ

1. 研究開始当初の背景

魚類は典型的な変温動物で、その体温は環境水温の変化に対応して変化する。一般の化学反応は温度が高いほど速く進み、魚類の体内といえどもその代謝は化学反応で行われているにも関わらず、魚類の代謝速度は体温が変化してもほぼ一定に保たれている。この代謝速度の恒常性は、魚類体内の種々の分子が複雑なネットワークを介して維持しているものと考えられるが、その詳細はほとんど明らかにされていない。申請者は既に広温域性淡水魚のコイやメダカの筋肉を対象に、筋主要タンパク質のミオシンが温度馴化で異なるアイソフォームを発現し、その発現変動が筋特異的転写因子 MEF2 によって制御されていることを明らかにしている (Liang et al., 2008)。

2. 研究の目的

本研究では、最新の遺伝子データベースや遺伝子解析ソフトを利用して遺伝子転写産物の網羅的解析を行い、ミオシン・アイソフォームの発現調節因子を含む、魚類の温度適応を制御するネットワーク分子群の包括的研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 24°C に馴致したメダカにつき、飼育水温を 10 および 30°C に 1 時間に 3°C ずつ変化させ、設定温度に達した直後および 30 日以上飼育して温度馴化させた魚体の筋組織から全 RNA を抽出した。その後、Dynabeads mRNA DIRECT MicroKit を用いて mRNA を精製した。精製 mRNA から Ion Total RNA-Seq v2 を用いて cDNA ライブラリーを作製し、バイオアナライザーを用いて DNA のサイズおよび濃度を測定した。cDNA ライブラリーの塩基配列は Ion Torrent PGM シークエンサーを用いて決定した。得られた塩基配列は CLC Genomic Workbench を用いて *de novo* アセンブリおよび発現変動遺伝子の検索を行った。さらに、Ensembl のメダカゲノム配列をリファレンス配列として、得られた全リードのうち 25 塩基以上のものを bowtie2-Tophat ソフトウェアを用いてマッピングした。マッピングされた遺伝子につき Cuffdiff ソフトウェアを用いて定量し、発現量に差のある遺伝子を同定した。

(2) メダカ筋肉より全 RNA を抽出し、1st strand cDNA 合成後、FastStart Essential DNA Green Master および LightCycler Nano を用いて定量 PCR を行った。リファレンスとして EF1- 遺伝子を用い、相対定量解析を行った。

4. 研究成果

(1) 温度馴化したメダカより筋肉を採取し、転写産物の網羅的解析を行ったところ、10 および 30 馴化のメダカ筋肉で解析された塩基数は、それぞれ 629.25 および 534.08Mb

であった。さらに、リード数はそれぞれ 5,364,077 および 4,675,370 で、平均リード長はそれぞれ 117 および 114 塩基であった。10 および 30 馴化魚ライブラリーのリードを混合し、CLC Genomics Workbench を用いた *de novo* アセンブリを行い解析したところ、平均長 455bp の 11,838 コンティグを得ることができた。さらに詳細な解析で、ミオシン重鎖遺伝子群の発現変動が顕著であることが示された。このほか、30 馴化魚においては、高温耐性ニジマスに発現量が多いことが知られている (Tan et al., 2012) HSP70 および dnaJ homolog の発現量の増大がみられた。これに対して、10 馴化魚では、カルボン酸レダクターゼやデヒドロゲナーゼなど代謝関連の酵素をコードする遺伝子の発現量の増大がみられた。

(2) メダカでは全ゲノム情報を利用できることから、bowtie2-Tophat および Cuffdiff ソフトウェアを用いた解析系を確立した。10 および 30 馴化魚の筋肉の cDNA ライブラリーから得られた 25 塩基以上のリード数は、それぞれ 4,750,081 および 4,213,260 で、その中、それぞれ 1,836,731 および 2,094,008 個をアノテーションされているゲノム配列にマッピングすることができた。マッピングされた遺伝子を対象に馴化温度依存的な発現変動を Cuffdiff ソフトウェアを用いて解析したところ、10 馴化魚の筋肉では FBX032、GLS2 をコードする遺伝子など 11 種類、30 馴化魚では仔魚型ミオシン重鎖、HSP70、DNAJ など 20 種類の遺伝子の発現量が有意に高いことが示された (図 1)。10 および 30 馴化魚の筋肉で発現変動した 31 遺伝子中、とくに変化が大きかった遺伝子の発現量を定量 PCR 法で解析した。その結果、仔魚型ミオシン重鎖、HSP70 および dnaJ4 の発現量が 30°C 馴化魚で、FBX032 および GLS2 の発現量が 10°C 馴化魚でそれぞれ高いことが定量 PCR 法でも確認され、その差は 9.4 ~ 89.2 倍であった。

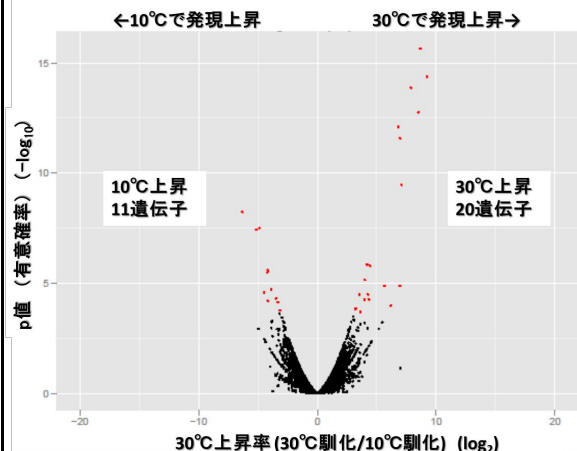


図 1. Volcano plot による筋組織における発現量の比較。赤い点は発現量に有意差のある遺伝子を表す。

(3) 10 および 30°C 馴化魚の脳から得られた 25 塩基以上のリード数はそれぞれ 6,492,433 および 5,541,982 で、それぞれ 2,713,151 および 2,630,520 個をアノテーションされているゲノム配列にマッピングすることができた。これらマッピングされた遺伝子中、10°C 馴化魚では 11 種類、30°C 馴化魚では 9 種類の遺伝子の発現量が有意に高いことが示され、その差は 2.8 ~ 22.8 倍であった(図 2)。

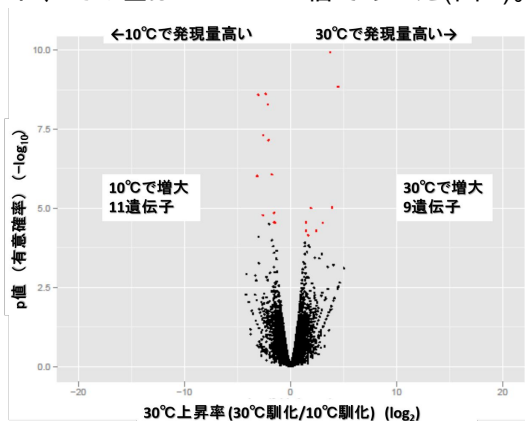


図 2. Volcano plot による脳組織における発現量の比較。赤い点は発現量に有意差のある遺伝子を表す。

(4) 24°C 飼育、10 および 30°C 変化直後、および 10 および 30°C で 30 日間以上飼育後の 5 点間におけるメダカ筋肉の遺伝子発現量を比較したところ、159 遺伝子に馴化温度依存的な差異が明白に認められた。10 および 30°C 馴化メダカ間で発現量に差が認められた 31 遺伝子につき、温度変化直後の変化を調べたところ、シスタチオナーゼ遺伝子 (*CTH*) は 10°C への変化直後から発現量が増大していた。また、30°C への変化直後のメダカでは、熱ショックタンパク質遺伝子 (*HSP70*, *DNAJ4A*, *HSPAB*, *HSP90AA1* および *hsp70.3*) の発現量が増大していたのに対し、E3 コピキチンリガーゼ (*FBOX32/Atrogin-1/MAFbx-1*) およびピルビン酸脱水素酵素キナーゼ 2 遺伝子 (*PK2*) の発現量は減少していた。しかしながら、今回の網羅的解析ではこれまでに報告のある 10°C 型および 30°C 型ミオシン重鎖遺伝子 (*MYH*) の有意な発現変動 (Liang et al., 2007) は認められなかった。メダカでは温度馴化に関する *MYH* はゲノム上でクラスターを形成していることから (Liang et al., 2007)、用いたリファレンス配列に不備がある可能性が示された。そこで、クラスター構造を反映させた DNA 配列をリファレンス配列として用い、マッピングおよび遺伝子発現量の差異を解析したところ、既報の 10°C 馴化型 *MYH* 群は、今回の実験でもいずれもその発現量が 10°C 馴化魚で 30°C 馴化魚より 2 倍以上高かった。また、5 種類の 30°C 馴化型 *MYH* 中、2 遺伝子でその発現量が 10°C 馴化魚に比べて 30°C 馴化魚の方が 2 倍以上高かった。

以上のことから、30°C 馴化魚では熱シヨク

クタンパク質の発現量を増大させることでタンパク質のリフォールディングを促進するとともに、ミオシン重鎖を 30°C 型に変化させることにより高温域での遊泳能力を維持することが示唆される。一方、10°C 馴化魚では代謝関連酵素の発現量をを増加させるとともに、ミオシン重鎖遺伝子を 10°C 型に変化させることにより低温域での遊泳能力を維持することが示唆される。これら分子の発現調節機構の解明が今後に残された課題である。

<引用文献>

Chun-Shi Liang, Daisuke Ikeda, Shigeharu Kinoshita, Atsushi Shimizu, Takashi Sasaki, Shuichi Asakawa, Nobuyoshi Shimizu, Shugo Watabe (2008). Myocyte enhancer factor 2 regulates expression of medaka *Oryzias latipes* fast skeletal myosin heavy chain genes in a temperature-dependent manner. *Gene* 407:42-53.

Engkong Tan, Chaninya Wongwarangkana, Shigeharu Kinoshita, Yutaka Suzuki, Kenshiro Oshima, Masahira Hattori, Toshinao Ineno, Koichi Tamaki, Akio Kera, Koji Muto, Takashi Yada, Shoji Kitamura, Shuichi Asakawa, Shugo Watabe (2012). Global gene expression analysis of gill tissues from normal and thermally selected strains of rainbow trout. *Fish. Sci.* 78:1041-1049.

Chun-Shi Liang, Atsushi Kobiyama, Atsushi Shimizu, Takashi Sasaki, Shuichi Asakawa, Nobuyoshi Shimizu, Shugo Watabe (2007). Fast skeletal muscle myosin heavy chain gene cluster of medaka *Oryzias latipes* enrolled in temperature adaptation. *Physiol. Genomics* 29:201-214.

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 4 件)

A. K. Shakur Ahammad, Shigeharu Kinoshita, Md. Asaduzzaman, Shuichi Asakawa, Shugo Watabe (2015). Regulation of gene expression mediating indeterminate muscle growth in teleosts. *Mech. Development*, Accepted in March 25, pii: S0925-4773(15)00026-X, 2015. DOI: 10.1016/j.mod.2015.02.006. 査読有

Gen Kaneko, Akiko Sawada, Hideki Ushio, Shugo Watabe (2013). Effects on short-term cold acclimation on F0F1-ATPase activity in skeletal muscle of red seabream *Pagrus major* (Temminck & Schlegel).

Aquaculture Res. 45:1-4. DOI:
10.1111/are.12132. 査読有

Daisuke Ikeda, Yosuke Ono, Shigeki Hirano, Nobuhiro Kan-no, Shugo Watabe (2013). Lampreys have a single gene cluster for the fast skeletal myosin heavy chain gene family.

PLOS ONE, 8:e85500. DOI:
10.1371/journal.pone.0085500. 査読有

Engkong Tan, Chaninya Wongwarangkana, Shigeharu Kinoshita, Yutaka Suzuki, Kenshiro Oshima, Masahira Hattori, Toshinao Ineno, Koichi Tamaki, Akio Kera, Koji Muto, Takashi Yada, Shoji Kitamura, Shuichi Asakawa, Shugo Watabe (2012). Global gene expression analysis of gill tissues from normal and thermally selected strains of rainbow trout. Fish. Sci, 78:1041-1049. DOI:
10.1007/s12562-012-0522-4. 査読有

〔学会発表〕(計 5件)

水澤奈々美、加賀谷禎子、牛島玲奈、池田大介、小山寛喜、陳 盈光、浅川修一、安元 剛、神保 充、菅野信弘、渡部終五
急激に水温変動させたメダカの筋肉の RNA-seq 解析
平成 27 年度日本水産学会春季大会、平成 27 年 3 月 27 日-31 日、東京海洋大学品川キャンパス

池田大介、菅野信弘、渡部終五
シーラカンス側近型ミオシン重鎖遺伝子の機能解析
平成 26 年度日本水産学会秋季大会、平成 26 年 9 月 19 日-22 日、九州大学箱崎キャンパス

池田大介、小山寛喜、菅野信弘、陳盈光、浅川修一、安元剛、神保充、渡部終五
メダカの温度馴化で発現変動する遺伝子転写産物の同定
平成 26 年度日本水産学会春季大会、平成 26 年 3 月 27 日-3 月 31 日、北海道大学函館キャンパス

池田大介、小山寛喜、菅野信弘、陳盈光、浅川修一、安元剛、神保充、渡部終五
次世代シーケンサーおよびゲノムデータベースを利用したメダカの温度馴化で発現する遺伝子転写産物の網羅的解析
平成 25 年度日本水産学会秋季大会、平成 25 年 9 月 19 日-9 月 22 日、三重大学

池田大介、小山寛喜、齊木洋司、菅野信弘、陳盈光、浅川修一、安元剛、神保充、渡部終五
温度依存的に発現するメダカ遺伝子転写産物の網羅的解析

平成 25 年度日本水産学会春季大会、平成 25 年 3 月 28 日、東京海洋大学品川キャンパス

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡部 終五 (WATABE, Shugo)
北里大学・海洋生命科学部・教授
研究者番号：40111489

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

池田 大介 (IKEDA, Daisuke)
北里大学・海洋生命科学部・講師

水澤 奈々美 (MIZUSAWA, Nanami)
北里大学・海洋生命科学部・博士研究員