

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 4 月 29 日現在

機関番号：32621

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770231

研究課題名(和文) 進化過程における新規な組織器官の形成メカニズム：魚類育児嚢の進化

研究課題名(英文) Mechanism of formation of brood pouch during the evolution of seahorses

研究代表者

川口 眞理 (Kawaguchi, Mari)

上智大学・理工学部・助教

研究者番号：00612095

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：タツノオトシゴ類の育児嚢が進化過程でなぜ・どのようにして形成されたのかを明らかにすることを目的として、育児嚢で特異的に発現している遺伝子の解析及び育児嚢の形態観察を行った。その結果、卵を保有前は発現していないが、卵を保有中の育児嚢で発現している遺伝子「子育て遺伝子」が約100個見出された。これらの遺伝子のクローン化及び発現領域の解析を進めた。これらの遺伝子をマーカーとすることで、今後は育児嚢がタツノオトシゴの発生過程で、さらには、その進化過程でどのように形成されていくのかを調べることが可能となる。本研究により、魚類の育児嚢の進化過程を明らかにするための基盤を作ることができた。

研究成果の概要(英文)：Molecular analysis of the genes specifically expressed in brood pouch and morphological analysis of the pouch were performed in the present study to understand how and why the brood pouch was formed during the evolution of seahorses. Expression levels of the genes in brood pouch were compared between brooding males and non-brooding males. As the results, 100 genes were found as up-regulated genes in brooding males. Their full-length sequences were determined, and their localizations were analyzed by in situ hybridization or by immunohistochemistry. These genes can be used for marker for formation of the brood pouch, by analyzing localization of the genes during the development of the brood pouch. The present study provides back ground to study evolutionary pathway of the formation of brood pouch in seahorses.

研究分野：進化生物学

キーワード：タツノオトシゴ 育児嚢 パトリスタシン C型レクチン コラーゲン

1. 研究開始当初の背景

本研究で着目したのがタツノオトシゴ類の「保育」器官である。タツノオトシゴは、オスが腹部に育児嚢と呼ばれる袋状の器官を持ち、メスが育児嚢内に卵を産み、オスが精子を放出して受精させる。受精した卵はオスの育児嚢内で胎盤様構造 (placenta-like structure) と呼ばれる組織に包み込まれている (Stöting and Anthony, 2007)。オスは稚魚になるまで保護し、その後「出産」することが知られている (Foster and Vincent, 2004)。育児嚢はタツノオトシゴ類に特異的に見られる器官である。その形態学的な研究はいくつか行われているが、分子レベルでの研究はあまり進んでいない。

2. 研究の目的

本研究では、オスが抱卵中の育児嚢で特異的に発現している遺伝子のクローン化とその機能解析を行うことで、タツノオトシゴ類の保育の分子メカニズムを明らかにすることを目的とし、以下の3点に着目した。

(1) 保育に関わる遺伝子の同定

卵は育児嚢内で蜂の巣構造になった組織 (胎盤様構造) に包み込まれるようにして保育されている (Carcupino et al., 2002)。蜂の巣構造はどのようなタンパク質で構成されているのだろうか? また、オスの育児嚢内にある未受精卵は吸収され、受精卵の生存率を高めている可能性も示唆されている (Ahnesjö, 1996)。これらのことから、育児嚢の表面には卵表面、つまり卵膜を認識・結合するタンパク質 (接着タンパク質) が存在すると考えられる。

(2) 遺伝子の多様性進化

育児嚢の形態をさらにヨウジウオの近縁種に広げてみると、系統ごとに多種多様な構造をしている (Wilson et al., 2001)。タツノオトシゴやヨウジウオでは育児嚢はよく発達し、袋状の形態をしている。他方、その近縁種では育児嚢は未発達で袋状の構造物はなく、尾の近くの表皮上に卵をのせるだけの種もいる。相同遺伝子が進化過程でどのように変化し、このような形態の多様性をもたらしているのかを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 育児嚢で特異的に発現する遺伝子の網羅的解析

育児嚢が未発達のオス、成熟し求愛行動はしているが卵をまだ保育していないオス、および、卵を保育しているオスの合計3種類の発達段階のタツノオトシゴの育児嚢からRNAを抽出した。各段階のオスの育児嚢で発現している遺伝子を次世代シーケンサー (Illumina 社 Genome Analyzer) を用いて網羅的に解析を行った。卵保育期で発現している全遺伝子から、育児嚢が未発達の時期もしく

は成熟してはいるが卵を保有前の育児嚢でも共通に発現している遺伝子を除くことにより、卵保育中の胎盤様構造特異的な遺伝子を同定した。

(2) 育児嚢特異的なタンパク質の機能解析

次世代シーケンサーで同定した配列は遺伝子の部分配列である。そこでcDNAの全長配列を得るためにRACE PCRを行った。このうちパトリスタシン遺伝子、コラーゲン様遺伝子、C型レクチン遺伝子について全長のクローン化し、それぞれの抗体を作成し、その局在を免疫組織染色法により調べた。

(3) 相同遺伝子の進化

パトリスタシン遺伝子の進化

パトリスタシンはアスタシンプロテアーゼファミリーに属している。アスタシンプロテアーゼファミリーには、パトリスタシンの他に、魚類では孵化酵素、ネフロシン、C6AST2などが知られている。そこでこれらの遺伝子をタツノオトシゴからクローン化した。また、ゲノムデータベースを利用してパトリスタシン相同遺伝子を他の魚類から探査し、これらの配列を用いて系統解析を行い、パトリスタシン遺伝子の進化過程を考察した。

コラーゲン様遺伝子の進化

タツノオトシゴからゲノムDNAを抽出し、その配列を次世代シーケンサーを用いて決定し、タツノオトシゴのゲノムデータベースを作成した。このデータベースを用いて、既知の28個のコラーゲン遺伝子の相同遺伝子の探査を行った。これらの配列を用いて系統解析を行うことにより、タツノオトシゴの育児嚢特異的なコラーゲン遺伝子の進化過程を考察した。

(4) 育児嚢の形態学的な観察

オスは育児嚢内で卵を胎盤様構造に包み込むようにして保護している。では、胎盤様構造はオスがメスから卵を受け取る前から発達しているのだろうか? そこで、本研究では、胎盤様構造の発達段階を追って育児嚢の形態学的な観察を行った。種々の発達段階の胎盤様構造を持つオスや卵を飼育中のオスの育児嚢の形態を、組織切片を作成しながらHE染色により継時的に観察した。

4. 研究成果

(1) 育児嚢で特異的に発現する遺伝子の網羅的解析とその発現解析

卵を保有中の育児嚢で発現が強まる遺伝子が100個見つかった。これらの発現領域をRT-PCR法で調べ、他の臓器では発現せず、育児嚢特異的に発現している遺伝子18個に焦点を当て、全長のクローン化を進めた。その結果、パトリスタシン遺伝子、コラーゲン

様遺伝子、キチナーゼ様遺伝子の全長のクローン化に成功した。パトリスタシンとコラーゲン様タンパク質の抗体を作成して局在を調べた結果、どちらも卵を保育中の育児嚢の上皮層に特異的に局在していることが示唆された。コラーゲン様タンパク質については解析を進めているが、まだ明確な結果を得られていない。

(2) アスタシンプロテアーゼファミリー遺伝子の進化

パトリスタシンは魚類に特有のシステインを6つ持つアスタシンプロテアーゼ(C6AST)に属している。タツノオトシゴからパトリスタシンの他に3種類のC6AST遺伝子、孵化酵素 HCE 遺伝子・ネフロシン遺伝子・C6AST2 遺伝子をクローン化した。in situ ハイブリダイゼーション法でそれぞれの発現局在を調べた結果、HCE 遺伝子は胚で、ネフロシンは腎臓で、C6AST2 遺伝子は腸間膜で発現していることが分かった。これらの発現局在は、メダカなど他の魚類で知られている相同遺伝子の発現局在と一致していた。

パトリスタシン遺伝子は育児嚢で発現しているが、プラティーやティラピアのゲノムデータベースを探索するとその相同遺伝子が見つかった。プラティーには6つのパトリスタシン相同遺伝子があり、その全長をクローン化して発現解析を行った。その結果、顎や鰓など様々な臓器で発現していた。この結果は、鰓などで機能していたパトリスタシン遺伝子は、タツノオトシゴ類の進化過程で育児嚢を獲得したのに伴い、発現領域が変化したことを示唆している。

一方、孵化酵素は孵化時に卵膜を分解する酵素である。タツノオトシゴが属する正真骨魚類では HCE と LCE の 2 種類の孵化酵素によって卵膜が分解される。しかしながら、タツノオトシゴからは HCE 遺伝子のみしかクローン化できなかった。本研究で作製したタツノオトシゴのゲノムデータベースを探索したところ、LCE 遺伝子の断片配列は見つかったが、全長は見つからず、LCE 遺伝子が偽遺伝子化していることが分かった。タツノオトシゴの卵膜を電子顕微鏡で観察してみると、厚さが薄かった。そのため、LCE が機能しなくても卵膜を分解して孵化できるのかもしれない。

(3) コラーゲン様遺伝子の進化

上述した育児嚢特異的なコラーゲン様遺伝子の進化過程を考察するために、タツノオトシゴのゲノムデータベースを利用してコラーゲン遺伝子を探索し、系統解析を行った。その結果、育児嚢特異的なコラーゲン様遺伝子はコラーゲン 15 もしくは 18 のコラーゲンドメインが重複して生じたことが示唆され、育児嚢で特異的に機能するようになったと考えられる。

(4) 育児嚢の形態学的な観察

育児嚢の連続切片を作製し、HE 染色を行った結果、育児嚢は嚢内腔側から順に、育児嚢の上皮、胎盤様構造、筋肉層、真皮層からなっていた。

育児嚢の形成過程を育児嚢の発達段階ごとに観察するために、育児嚢のマーカージェン遺伝子の探索を行った。その候補遺伝子として、卵保育中に発現が強まる遺伝子ではないが、種々の発達段階を通じて発現が強く、かつ、他の臓器では発現しない育児嚢特異的な遺伝子として C 型レクチン遺伝子が見つかった。そこで、その組換えタンパク質を作製して抗原とすることで、抗体を作製して局在を調べた結果、育児嚢内の上皮に局在していた。そこで、C 型レクチンを育児嚢のマーカージェンとして育児嚢の発達段階ごとに育児嚢の連続切片を作成し、タツノオトシゴの成長過程でどのように育児嚢が形成されていくのかを調べた結果、上皮層が陥入して育児嚢が形成されていく過程を明らかにすることができた。

本研究成果はタツノオトシゴの育児嚢の形成や保育時に働く遺伝子の一部を明らかにするものである。本研究で明らかにできたこれらの遺伝子をマーカージェンに用いることで、近縁種間での比較を通してタツノオトシゴ類の進化過程でどのように育児嚢が形成されてきたのかを明らかにできる。本研究により、育児嚢の進化を明らかにしていくための基礎的な知見を提供できた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 9 件)

Mari Kawaguchi, Kenji Tomita, Kaori Sano, and Toyoji Kaneko, 2015. Molecular events in adaptive evolution of the hatching strategy of ovoviviparous fishes. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 324: 41-50. DOI: 10.1002/jez.b.22601

Mari Kawaguchi, Kaori Sano, Norio Yoshizaki, Daisuke Shimizu, Yuichiro Fujinami, Tsutomu Noda, and Shigeki Yasumasu, 2014. Comparison of hatching mode in pelagic and demersal eggs of two closely related species in the order Pleuronectiformes. *Zoological Science*, 31: 709-715.

DOI: 10.2108/zs140018

Mari Kawaguchi, Koji Inoue, Ichiro Iuchi, Mutsumi Nishida, and Shigeki Yasumasu, 2013. Molecular co-evolution of a protease and its substrate elucidated by analysis of the activity of predicted ancestral hatching enzyme. *BMC Evolutionary Biology*, 13:231.

DOI: 10.1186/1471-2148-13-231

Mari Kawaguchi, Hiroshi Takahashi,

Yusuke Takehana, Kiyoshi Naruse, Mutsumi Nishida, and Shigeki Yasumasu, 2013. Sub-functionalization of duplicated Genes in the evolution of nine-spined stickleback hatching enzyme. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 320: 140-150.

DOI: 10.1002/jez.b.22490

Mari Kawaguchi, Shigeki Yasumasu, Akio Shimizu, Norio Kudo, Kaori Sano, Ichiro Iuchi, and Mutsumi Nishida, 2013. Adaptive evolution of fish hatching enzyme: One amino acid substitution results in differential salt dependency of the enzyme. *The Journal of Experimental Biology*, 216: 1609-1615.

DOI: 10.1242/jeb.069716

Mari Kawaguchi, Sébastien Lavoué, Junya Hiroi, Hirofumi Hayano, Ichiro Iuchi, Shigeki Yasumasu, and Mutsumi Nishida, 2012. Remarkable consistency of exon-intron structure of hatching enzyme genes and molecular phylogenetic relationships of teleostean fishes. *Environmental Biology of Fishes*, 94: 567-676.

DOI: 10.1007/s10641-011-9920-1

〔学会発表〕(計 23 件)

川口眞理・井上広滋・安増茂樹 「多重コピー遺伝子の多様性～メダカ属の孵化酵素の至適塩濃度～」第 85 回日本動物学会、仙台、2014 年 9 月(口頭発表)
大窪遼平・高田健介・川口眞理 「タツノオトシゴの育児嚢特異的な C 型レクチンのクローン化と発現局在」第 85 回日本動物学会、仙台、2014 年 9 月(口頭発表)

川口眞理・中野悠子・川原玲香・今福愛子 「タツノオトシゴの育児嚢特異的なアスタシンプロテアーゼファミリー遺伝子」第 16 回日本進化学会、大阪、2014 年 8 月(ポスター発表)

長澤竜樹・川口眞理・矢野十織・岡部正隆・安増茂樹 「古代魚を用いた孵化腺細胞の発生進化的解析」第 16 回日本進化学会、大阪、2014 年 8 月(口頭発表)

中野悠子・今福愛子・川口眞理 「patristacin 遺伝子の進化」第 66 回日本動物学会関東支部大会、千葉、2014 年 3 月(ポスター発表)

川口眞理・井上広滋・安増茂樹 「メダカ属の孵化酵素 HCE の至適塩濃度」第 66 回日本動物学会関東支部大会、千葉、2014 年 3 月(ポスター発表)

川口眞理・井上広滋・安増茂樹 「メダカ孵化酵素 HCE の 2 つのアイソザイムの至適塩濃度」第 84 回日本動物学会、岡山、2013 年 9 月(口頭発表)

川口眞理・安増茂樹 「卵胎生魚の孵化酵素遺伝子」第 15 回日本進化学会、つくば、2013 年 8 月(口頭発表)

今福愛子・川口眞理 「タツノオトシゴのアスタシンファミリープロテアーゼ遺伝子の探査」第 65 回日本動物学会関東支部大会、東京、2013 年 3 月(ポスター発表)

木浦知香・川口眞理 「タツノオトシゴ collectin placenta 遺伝子のクローン化と組換えタンパク質の作成」第 65 回日本動物学会関東支部大会、東京、2013 年 3 月(ポスター発表)

宮地央・川原玲香・河野友宏・川口眞理 「タツノオトシゴの育児嚢で発現している遺伝子の網羅的解析」第 65 回日本動物学会関東支部大会、東京、2013 年 3 月(ポスター発表)

〔図書〕(計 2 件)

Shigeki Yasumasu and Mari Kawaguchi, 2013. Choriolysin H. In Neil D. Rawlings and Guy S. Salvesen, editors: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Oxford: Academic Press, pp.945-949.

Shigeki Yasumasu and Mari Kawaguchi, 2013. Choriolysin L. In Neil D. Rawlings and Guy S. Salvesen, editors: *Handbook of Proteolytic Enzymes*, Oxford: Academic Press, pp.942-945.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

川口眞理 (Kawaguchi, Mari)

上智大学・理工学部・助教

研究者番号: 00612095