

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780178

研究課題名(和文) ヒラメ変態過程における左右非対称化の分子メカニズムの解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of left-right asymmetric differentiation of flounder metamorphosis

研究代表者

横井 勇人 (Yokoi, Hayato)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：40569729

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：ヒラメの変態は左右非対称な眼の移動と色素胞分化を伴う興味深い現象であり、水産増養殖の高効率化の観点からも重要なプロセスである。変態は甲状腺ホルモンにより制御されているが、その分子基盤は不明な点が多い。本研究では次世代シーケンサーにより遺伝子発現プロファイルを解析し、有眼側と無眼側で発現強度の異なる遺伝子を網羅的に同定した。有眼側で強い遺伝子を32、無眼側について7つの遺伝子が得られた。現在、in situ hybridizationにより組織発現を解析し、実際に左右非対称に発現している遺伝子のスクリーニングを進めている。今後は甲状腺ホルモンとの相関についても明らかにしたい。

研究成果の概要(英文)：Flounder transform their body plan during metamorphosis and turn into asymmetric body form with two eyes on left side and ocular-side pigmentation. Metamorphosis is triggered by thyroid hormone signal, however, little is known about molecular basis of the metamorphic morphogenesis. Here, we compared gene expression profile between ocular and blind side by RNA-seq analysis using next generation sequencer, which identified 32 ocular side dominant genes and 7 blind side dominant genes. These candidates are now under screening by in situ hybridization to confirm left-right biased gene expression. So far, most of them showed biased gene expression as expected, which include known pigmentation genes such as gch2.

研究分野：マリンゲノミクス

キーワード：ヒラメ 変態 異体類 左右非対称化

## 1. 研究開始当初の背景

一般に脊椎動物の外部形態は左右対称であるが、ヒラメやカレイなどの異体類では両眼が体の片側にあり、体色も有眼側と無眼側で異なるなど、成体で顕著な左右非対称性を示すことが特徴的である。さらに異体類が興味深いのは、仔魚期には一般的な魚類と同様にいったん左右対称に成長し、変態によって形態を劇的に変化させることである。左右に1つずつ形成された眼は変態期に移動して片側に配置し、色素細胞は有眼側と無眼側で分化パターンが異なる。このように異体類は生物学的に大変興味深い特徴を備えていることに加えて、ヒラメやホシガレイのように市場価値の高い魚種が多く含まれており、水産増養殖の観点からも重要である。近年ではNature誌に異体類の進化起源に関する論文(Friedman, 2008)が掲載され世界的に注目が高まっている。

ヒラメ・カレイ類は大型になるため、一般的な実験室で飼育して胚を得ることはほぼ不可能であるが、日本では種苗生産・放流事業が行われていることから、変態前のサンプルを入手することができる。このような世界的にも稀な恵まれた環境をいかして、異体類の変態に関する研究分野では日本が常に世界をリードしてきた。ダイナミックな形態の再編を伴う変態の制御機構を研究し、甲状腺ホルモンを中心とした内分泌シグナルによって制御されていることを示したのも日本のグループである(Inui and Miwa, 1985)。これらの研究によって、異体類の変態に関する最大の疑問は解明されたが、一方で新たな疑問が生まれた。すなわち、ホルモンは体内を循環するため、体中に同様に伝達されるが、異体類の変態は顕著に左右非対称であることから、左右対称な甲状腺ホルモンのシグナルによってどのようにして非対称性が生まれるのか?という疑問である。本研究では、変態過程の左右非対称な形態形成の分子制御メカニズムを明らかにするために、遺伝子発現の違いという観点から研究を行うこととした。

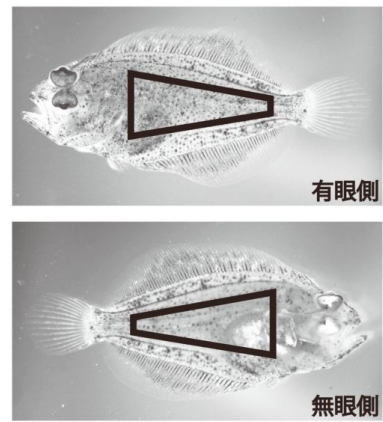
## 2. 研究の目的

ヒラメ変態過程において、有眼側と無眼側で異なる発現を示す遺伝子を網羅的に単離し、非対称に発現する遺伝子群を明らかにすることを目的とした。

### (1) 変態後サンプルの発現強度比較

まず有眼側と無眼側で色素細胞の分化に明瞭な違いが見られる変態後のステージにおいて、有眼側と無眼側の皮膚および筋肉組織からRNAを抽出し、発現強度の比較を行うこととした(実験1)。これらの組織は実験に必要なRNAの抽出が容易であり、研究の第一段階として適している。色素細胞の構成が顕著に異なることから、色素細胞分化や皮膚組織を構成する遺伝子が単離されることが予想された。

実験1. 左右非対称な色素細胞の分化



### (2) 変態初期の発現強度比較

次に、変態初期の非対称性を検出するために、眼球移動前の仔魚の眼球周辺の微細組織からRNAを抽出し、発現強度を比較することとした(実験2)。抽出する組織が小さいためRNA抽出と増幅に注意が必要であった。実験1では、甲状腺ホルモンに直接制御される遺伝子だけでなく、下流因子を含んで多くの遺伝子が単離されると考えられる。一方、実験2では左右の組織に違いが少ないことから、単離される遺伝子は少数である可能性があるが、甲状腺ホルモンによって直接的に制御されている遺伝子が含まれることが期待される。

## 3. 研究の方法

組織間の発現強度を比較する実験手法として、当初はサブトラクション法による実験を計画していたが、理化学研究所オミックスセンターの東北復興支援プロジェクトにより、次世代シーケンサーによるRNAseq解析を実施する機会を得た。当初の計画よりも網羅的であり、発現強度を数値化して定量的に評価することができた。

発現強度の比較を行った組織は、計画していた通り、(1)変態後の有眼側と無眼側サンプルと(2)変態初期の眼上棒状軟骨周辺の微細組織である。

## 4. 研究成果

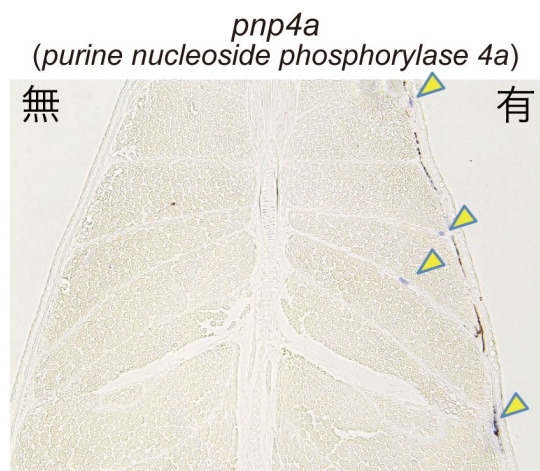
次世代シーケンサーHiSeq2000によるトランスクリプトーム解析により、ヒラメ変態期前後における遺伝子発現プロファイルを定量的に比較することができた。また、非モデル生物であるヒラメを用いた次世代シーケンズ解析はチャレンジングな課題であるが、同復興支援プロジェクトによりサポートされたCLC Genomics Workbenchを用いることにより解析の面でも困難を克服することができた。

(1) 次世代シーケンズ解析と de novo assemble

HiSeq2000 による RNA seq 解析により、100 bp ペアエンドの 4 億 2 千万リードの情報を得ることができた。データ解析には CLC Genomics Workbench を使用した。各種トリミングなど前処理の後、ワードサイズなどの条件を検討して de novo assemble を行った。ヒラメでは参照ゲノム配列が無いが、アセンブルしたコンティグに対してリードをマッピングして遺伝子発現強度の比較を行った。006w30 のアセンブルでは、N50 が 1,996 bp、最長コンティグは 64,157 bp、平均コンティグ長は 958 bp の 74,398 のコンティグが得られた。

(2) 左右で発現強度の異なる遺伝子の同定  
それぞれの組織のデュプリケートを考慮して統計解析を行い、Baggerley's test で P-value が 0.01 以下であり、かつ発現強度が 3 RPKM 以上で Weighted proportions fold change で 10 倍以上の差を示すコンティグを抽出した。有眼側で強いコンティグは 32、無眼側については 7 のコンティグが得られた。特に有眼側の遺伝子については、*tyrosinase-related protein 1a (tyrp1a)* や、*GTP cyclohydrolase 2 (gch2)* など、これまでに色素細胞分化に関与することが知られている遺伝子が多く含まれ、全体の 2/3 をしめた。これらは、黒色素細胞、黄色素細胞、白色素細胞および虹色素細胞の分化に重要な遺伝子がそれぞれ含まれていた。

(3) in situ hybridization による発現解析  
次世代シーケンス解析により同定された遺伝子は、クローニングして in situ hybridization を行い、実際に変態期のヒラメ組織において左右非対称に発現しているかどうか検証した。ケラチンでは有眼側と無眼側の表皮で発現し、有眼側の方が強い傾向が見られた。また上述した *gch2* などを含む複数の色素細胞分化関連遺伝子は有眼側のみで発現が観察された。皮下の分化した色素細胞のほか、色素細胞の前駆細胞や神経堤細胞と思われる筋間を移動中の細胞で発現が観察されるケースもあった。典型的な発現パターンを示した *pnp4a* の例を示した。



## 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 9 件)

- (1) Kato H, Abe K, Yokota S, Matsuno R, Mikekado T, Yokoi H and Suzuki T. (2015). Establishment of *oct4:gfp* transgenic zebrafish line for monitoring cellular multipotency by GFP fluorescence. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, 51(1): 42-49. 査読有.  
DOI: 10.1007/s11626-014-9805-7
- (2) Washio Y, Fujinami Y, Shimizu D, Yokoi H and Suzuki T. (2015). Exposure to oxidative by-products during metamorphosis affects pigmentation patterns in flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Aquaculture*, 435: 318-327. 査読有.  
DOI: 10.1016/j.aquaculture.2014.10.015
- (3) Shimoda N, Hirose K, Kaneto R, Izawa T, Yokoi H, Hashimoto N and Kikuchi Y. (2014). No evidence for AID/MBD4-coupled DNA demethylation in zebrafish embryos. *PLoS ONE*, 9(12): e114816. 査読有.  
DOI: 10.1371/journal.pone.0114816
- (4) Tatsumi Y, Takeda M, Matsuda M, Suzuki T and Yokoi H. (2014). TALEN-mediated mutagenesis in zebrafish reveals a role of *r-spondin2* in fin ray and vertebral development. *FEBS Letter.*, 588(24): 4543-4550. 査読有.  
DOI: 10.1016/j.febslet.2014.10.015
- (5) Shimoda N, Izawa T, Yoshizawa A, Yokoi H, Kikuchi Y and Hashimoto N. (2014). Decrease in cytosine methylation at CpG island shores and increase in DNA fragmentation during zebrafish aging. *Age (Dordr.)*, 36(1): 103-115. 査読有.  
DOI: 10.1007/s11357-013-9548-5
- (6) Kawanishi T, Kaneko T, Moriyama Y, Kinoshita M, Yokoi H, Suzuki T, Shimada A and Takeda H. (2013). Modular development of the teleost trunk along the dorsoventral axis and *zic1/zic4* as selector genes in the dorsal module. *Development*, 140(7): 1486-1496. 査読有.  
DOI: 10.1242/dev.088567
- (7) Washio Y, Aritaki M, Fujinami Y, Shimizu D, Yokoi H and Suzuki T. (2013). Ocular-side lateralization of adult-type chromatophore precursors: Development of pigment asymmetry in metamorphosing flounder larvae. *J. Exp. Zool. B, Mol. Dev. Evol.*, 320(3):

151-165. 査読有.  
DOI: 10.1002/jez.b.22491

- (8) Watanabe N, Itoh K, Mogi M, Fujinami Y, Shimizu D, Hashimoto H, Uji S, Yokoi H and Suzuki T. (2012). Circadian pacemaker in the suprachiasmatic nuclei of teleost fish revealed by rhythmic *period2* expression, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 178(2): 400-407. 査読有.  
DOI: 10.1016/j.ygcen.2012.06.012
- (9) 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 alpha-MSH synthesis in the pituitary and abnormal pigmentation, *Gen. Comp. Endocrinol.*, 176(2): 215-221. 査読有.  
DOI: 10.1016/j.ygcen.2012.01.017

〔学会発表〕(計 29 件)

- (1) 横井 勇人, 國政実里, 烏曉明, 酒井義文, 鈴木徹, ヒラメ仔魚の有眼側/無眼側の遺伝子発現プロファイリングで単離された色素胞関連遺伝子、平成 27 年度日本水産学会春季大会、2015 年 3 月 27-31 日、東京海洋大学(東京都・港区)
- (2) 横井 勇人、魚類におけるゲノム倍加と種特異的多様化、第 23 回関西おさかな勉強会、2014 年 12 月 5 日、京都大学(京都府・京都市)
- (3) Hayato Yokoi, Minori Kunimasa, Xiaoming Wu, Youhei Washio, Yoshifumi Sakai, Tohru Suzuki、Expression profiling of flounder metamorphosis identifies genes involved in pigment cell differentiation、20th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting、2014 年 9 月 20-21 日、慶応大学芝校舎(東京都・港区)
- (4) Hayato Yokoi, Xiaoming Wu, Minori Kunimasa, Yoshifumi Sakai, Tohru Suzuki、Transcriptome analysis identified genes enriched in ocular- or blind-side of flounder、11th International Conference on Zebrafish Development and Genetics、2014 年 6 月 24-28 日、Madison, Wisconsin (USA)
- (5) Hayato Yokoi, Xiaoming Wu, Yoshifumi Sakai, Tohru Suzuki、Identification of ocular- or blind-side enriched genes in flounder metamorphosis、47th Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists、2014 年 5 月 27-30 日、ウィンクあいち(愛知県・名古屋市)
- (6) 横井 勇人, 烏曉明, 酒井義文, 鈴木徹、ヒラメ仔魚の有眼側と無眼側で非対称に発現

する遺伝子の次世代シーケンサーによる解析、平成 26 年度日本水産学会春季大会、2014 年 3 月 27-29 日、北海道大学函館キャンパス(北海道・函館市)

(7) Youhei Washio, Hayato Yokoi, Tohru Suzuki, Flounder eye-sidedness can be experimentally randomized by transient treatment with a Nodal antagonist SB-431542 at somite stage、第 36 回日本分子生物学会年会、2013 年 12 月 3-6 日、神戸国際会議場(兵庫県・神戸市)

(8) 横井 勇人, 辰見吉昭, 阿部雄二, 武田萌, 松田勝, 鈴木徹、脊椎動物モデルとしての小型魚類と TALEN 革命、日本動物学会 第 84 回 岡山大会 2013 第 3 3 回胚誘導と形態形成」「第 23 回イモリ・ネットワーク」共催シンポジウム、2013 年 9 月 26-28 日、岡山大学(岡山県・岡山市)

(9) 鈴木徹, 茨木春美, 烏曉明, 酒井義文, 横井 勇人、ヒラメを対象にした次世代シーケンサーを使った de novo トランスクリプトーム解析、日本動物学会 第 84 回 岡山大会 2013 第 3 回ホメオスタシスバイオロジーシンポジウム：大規模解析と比較生物学研究、2013 年 9 月 26-28 日、岡山大学(岡山県・岡山市)

(10) Youhei Washio, Hayato Yokoi, Tohru Suzuki, Flounder eye-sidedness can be experimentally randomized by transient treatment with a Nodal antagonist SB-431542 at somite stage、19th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting、2013 年 9 月 20-21 日、仙台市情報産業プラザ(宮城県・仙台市)

(11) Hayato Yokoi, Xiaoming Wu, Yoshifumi Sakai, Tohru Suzuki, Transcriptome analyses of flounder metamorphosis left-right asymmetric differentiation、46th Annual meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists、2013 年 5 月 28-31 日、くにびきメッセ(島根県・松江市)

(12) 横井 勇人, 烏曉明, 酒井義文, 鈴木徹、変態期ヒラメ仔魚のトランスクリプトーム解析、平成 25 年度日本水産学会春季大会、2013 年 3 月 26-30 日、東京海洋大学(東京都・港区)

(13) 横井 勇人, 茨木春美, 烏曉明, 鷺尾洋平, 宇治督, 酒井義文, 鈴木徹、次世代シーケンサーを用いたヒラメのトランスクリプトーム解析の試み、アクアゲノム研究会 2013、2013 年 3 月 26 日、東京海洋大学(東京都・港区)

(14) Yuji Abe, Yoshihito Taniguchi, Yasuhiro Kamei, Kiyoshi Naruse, Tohru Suzuki, Hayato Yokoi、Characterization of thyroid grand

development in medaka, and isolation of thyroglobulin mutant using TILLING、第 18 回小型魚類研究会、2012 年 9 月 22-23 日、京都大学紫蘭会館（京都府・京都市）

(15) Hayato Yokoi, Yuji Abe, Tohru Suzuki, Thyroid gland development in medaka; toward a model to study metamorphosis、Joint Meeting of The 45th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists & The 64th Annual Meeting of the Japan Society for Cell Biology、2012 年 5 月 28-31 日、神戸国際会議場（兵庫県・神戸市）

〔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