

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850147

研究課題名(和文) マガキのグリコーゲン蓄積性に関する遺伝子の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of glycogen storage in the pacific oyster

研究代表者

馬久地 みゆき (Mekuchi, Miyuki)

国立研究開発法人水産総合研究センター・中央水産研究所・研究員

研究者番号：40594007

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：マガキの養殖は、近年、地球環境変動に伴う高水温によりグリコーゲン蓄積開始が遅れている。秋の出荷初期にグリコーゲンの蓄積不十分な低品質なマガキが出現し、産業上大きな問題となっている。本研究では産業上重要なマガキのグリコーゲン蓄積のメカニズムについて分子生化学的手法を用いて解明しようと試みた。秋の出荷初期にグリコーゲンが蓄積されている個体と蓄積不十分な個体における遺伝子発現量を比較したところ、インスリン関連の遺伝子群の発現量に変化があることが分かった。さらにインスリン関連の遺伝子に着目して解析を続けたところ、マガキインスリンの新規遺伝子であることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The Pacific oyster *Crassostrea gigas* accumulates reserves of glycogen in winter for gametogenesis and spawning in summer. After spawning during high-temperature summers, oysters become highly nutrient depleted; therefore, rapid glycogen synthesis and storage is important for recovery from these stresses. Despite the importance of glycogen storage, there is little detailed information on the underlying molecular mechanisms. Given this deficiency, we analyzed the gene expression profiles of oyster glycogen storage organs using next-generation sequencing. Pathway analysis revealed that glycogen storage has a relationship to insulin signaling pathway. This oyster insulin gene was a newly determined sequence.

研究分野：水産生理学

キーワード：代謝 グリコーゲン マガキ 生理学

1. 研究開始当初の背景

マガキは世界的に主要な養殖対象種であり、歴史的にも古くから養殖され、大正時代に垂下式養殖法が取り入れられ著しく発展した。しかしながら、現在でも種苗生産や育成管理において多くの問題が残されている。特に夏場の高水温、性成熟、産卵に伴う生理的活性低下による斃死は大きな問題である。出荷初期は性成熟や産卵の影響で肉質や重量が低下したカキ、放卵・放精により水分の多い水ガキ、未放出の配偶子を大量に保持しグリコーゲンの蓄積が不十分なカキなど低品質な個体が多く出現し、産業上深刻な問題となっている。このような問題を解決するためにはグリコーゲン蓄積開始が重要な鍵となる。これまでマガキの生理学および生態学における基礎的研究は盛んに行われてきたが、分子生物学的手法を用いた遺伝子レベルでの詳細な生理学的知見は乏しく、本問題の解決には至っていない。

2. 研究の目的

本研究ではマガキの産卵後期から出荷初期におけるグリコーゲンの蓄積機構を解明し、出荷初期にも十分なグリコーゲンを蓄積した高品質なマガキを出荷できるようにするための学術的な裏付けができる基礎的知見の収集を試みる。グリコーゲン蓄積には水温や性成熟などの複数要因が関わることを予測される。そこでグリコーゲン合成・分解酵素のみではなく、グルコース経路全体はもちろん発現遺伝子を網羅的に把握し、複雑なメカニズムを捉える必要がある。また、マガキのグリコーゲンの蓄積量には個体差があることに着目し、その違いを利用し遺伝子レベルで解明することを目的とした。

3. 研究の方法

マガキのグリコーゲン蓄積性の違いを遺伝子レベルで解明するため、次世代シーケンサーを用いてグリコーゲン蓄積群と非蓄積群における遺伝子発現量を網羅的に解析した。まず、マガキを一定条件で飼育し、初秋頃にマガキのグリコーゲン量を測定し、グリコーゲン蓄積個体と非蓄積個体を選別した。これらのマガキの全 RNA を抽出し、逆転写により cDNA ライブラリーを作製した。ライブラリーを次世代シーケンサーを用いてシーケンスし、リファレンス配列にマッピングし、遺伝子の発現量を算出した。次にグリコーゲン蓄積群と非蓄積群における発現量を比較し、差のある遺伝子を選別し、これらの遺伝子についてパスウェイ解析を行い、グリコーゲン蓄積に關与する遺伝子群を探索した。さらに選別されたグリコーゲン蓄積に關与する遺伝子についてその詳細を解析するために、組み換えタンパク質を用いて機能解析を行った。

4. 研究成果

マガキを一年間垂下飼育し、毎月定期的に採取した。9月から11月にかけてはグリコーゲン蓄積個体と非蓄積個体を選別し、比色定量法によりグリコーゲン含有量を測定したところ、10月にグリコーゲン蓄積の個体差が大きく現れることが分かった(図1)。

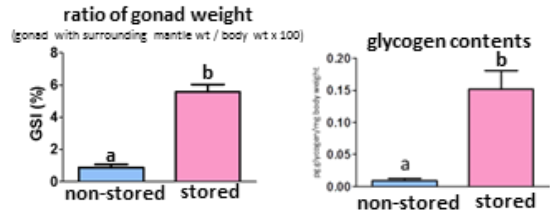


図1 (左) グリコーゲン蓄積部の重量指数
(右) グリコーゲン蓄積含量

水色はグリコーゲン非蓄積群、桃色はグリコーゲン蓄積群を示す。グラフ中のアルファベットは統計解析 (Turkey 法 $P < 0.05$) の結果を示す。

グリコーゲン定量後、マガキをグリコーゲン蓄積個体と非蓄積個体を選別し以下の実験を行った。それぞれの個体の肝臓と卵巣 cDNA ライブラリーを作製し、次世代シーケンサー (イルミナ社 HiSeq2000 シングルエンド法) を用いてシーケンスを行い、各サンプル約 1000 万リードの配列断片を得た。これらの配列断片を既報のマガキの全遺伝子配列引用文献にマッピングし、遺伝子発現量を算出した。肝臓では 15,570 個 (総遺伝子数の 55%) の遺伝子が発現しており、うち 2,416 個はグリコーゲン蓄積群と非蓄積群間で 2 倍以上 (FDR q-value < 0.1) の変動が見られた遺伝子であった。卵巣とその周辺の結合組織を含む組織では 23,131 個 (総遺伝子数の 82%) の遺伝子が発現しており、うち 3,111 個でグリコーゲン蓄積群と非蓄積群間で 2 倍以上の変動が見られた (表 1、図 2)。

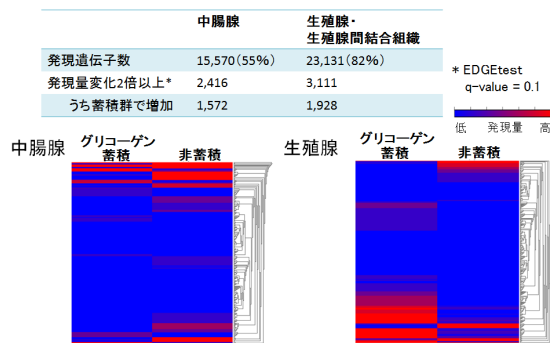


表 1 網羅的遺伝子発現解析の結果

図 2 遺伝子発現量比較をヒートマップで示した。

(左) 肝臓(中腸腺)(右) 生殖腺及びその周辺の結合組織
ヒートマップ中の左はグリコーゲン蓄積群、右は非蓄積群を示す。
赤色は発現量が高く、青色は発現量が低い。

また、遺伝子オントロジー解析を行った結果、分子機能 (molecular function) カテゴリー

分類においては肝臓、生殖腺ともに酵素として働く遺伝子が一番多く発現しており、体内作用による (molecular process) カテゴリー分類においては両組織ともに代謝に関連する遺伝子が多く発現していた (図3)

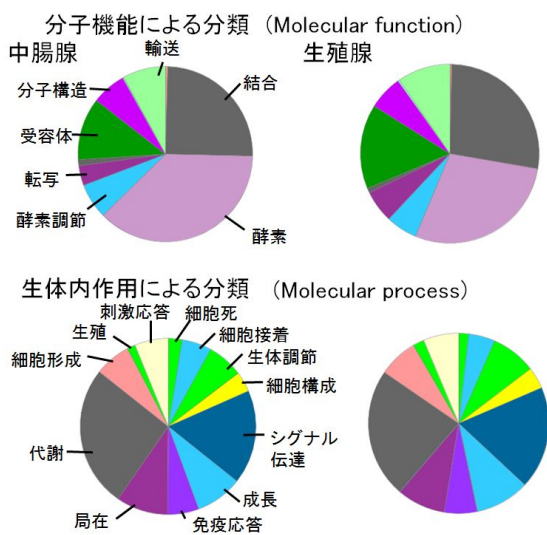


図3 遺伝子オントロジー解析
(上) 分子機能による分類、(下) 生体内作用による分類
(左) 肝臓 (右) 生殖腺

これら遺伝子の発現変動の結果を用いてパスウェイ解析を行ったところグルコース代謝経路における解析ではグリコーゲン合成酵素の関与が示唆されたため、次にグリコーゲン合成酵素に関する遺伝子の探索を行った。その結果インスリンシグナル伝達経路上に存在する遺伝子の関与が示唆された (図4)

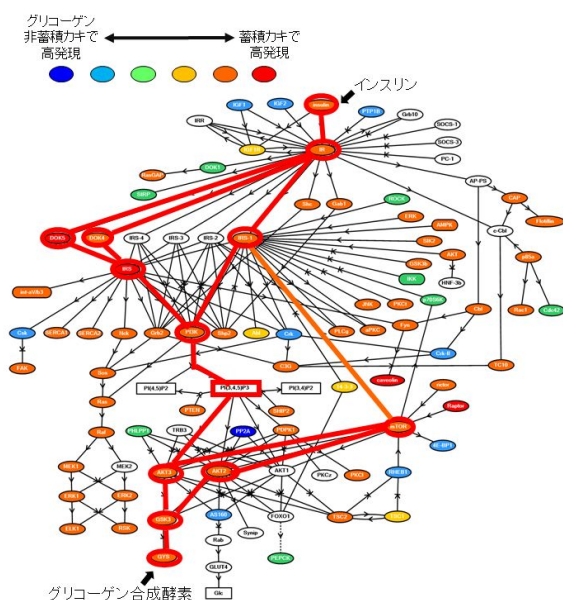


図4 肝臓におけるパスウェイ解析。インスリンシグナル経路を示す。精円は遺伝子を示す。赤はグリコーゲン蓄積群で高く発現している遺伝子。青はグリコーゲン非蓄積群で高く発現している遺伝子。インスリンからグリコーゲン合成酵素までの経路上の

遺伝子がグリコーゲン蓄積群で高く発現していた (赤線で強調)

これらのパスウェイは肝臓のみで関与が示唆されたが、卵巣におけるパスウェイの寄与率は低いことが示唆された。これらの結果を受けてマガキのインスリンについて詳細な解析を行うこととした。マガキインスリン遺伝子の全長配列を単離同定したところ、本遺伝子は新規のマガキインスリン遺伝子であることが分かった。また、このマガキインスリンには配列多様体が存在することも分かった。この配列多様体は配列の一部が欠失しているもので、配列多様体の存在はノーザンブロット法でも確認した。配列多様体は主体となるインスリン遺伝子よりも発現量が少なく、グリコーゲン蓄積に伴う発現量の変化は見られなかった。新規マガキインスリンの一次配列が決定されたので、本配列をもとに組み換えタンパク質を作製した。バキュロウイルスに目的配列を組み込み、昆虫細胞で発現させ、目的の組換えタンパク質を回収した。これらのタンパク質をマガキに投与し機能解析を行ったところ、投与後にグリコーゲン蓄積量に変動は見られたが、統計的に優位な差は見られなかった。

引用文献

Zhang G et al., 2014 Nature 490:49-54.

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1件)

馬久地みゆき、マガキのグリコーゲン蓄積を制御する遺伝子、中央水産研究所研究のうごき、査読なし、Vol 13、2015、pp.15、
http://nrifs.fra.affrc.go.jp/ugoki/pdf/ugoki_013_015.pdf

〔学会発表〕(計3件)

馬久地みゆき、マガキ中腸腺に発現する遺伝子の季節変動、平成26年度日本水産学会春季大会、2014年3月30日、「北海道大学函館キャンパス(北海道・函館市)」

馬久地みゆき、永江彬、松山幸彦、次世代シーケンサーを用いたマガキグリコーゲン蓄積に関する遺伝子の網羅的探索、平成27年度日本水産学会春季大会、2015年3月30日、「東京海洋大学品川キャンパス(東京都・港区)」

Mekuchi M., Nagae A., Matsuyama Y. Gene profiling of glycogen storage in the Pacific oyster using next-generation sequencing, The 9th international congress of comparative physiology and biochemistry, 2015年8

月 25 日、「クラクフ（ポーランド）」

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬久地 みゆき (MEKUCHI, Miyuki)

国立研究開発法人 水産総合研究センタ

ー 中央水産研究所・研究員

研究者番号：40594007