

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 10 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292110

研究課題名(和文) 次世代技術を活用した異体類体色の左右差形成の分子ネットワークへのアプローチ

研究課題名(英文) Approach to molecular system controlling left-right asymmetry of flatfish body color using next generation techniques

研究代表者

鈴木 徹 (SUZUKI, Tohru)

東北大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：70344330

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：ヒラメ・カレイ類は魚類一般と同じく胚発生で外見的に左右対称に発生した後、変態期に片側の眼球が体の反対側に移動し、続いて有眼側皮膚に色素胞が分化することにより体全体が左右非対称を形成する。増養殖用人工種苗では、体色異常(無眼側黒化、有眼側白化)が多発するために、その発生機序の解明が望まれている。本研究では、体色の左右差形成の制御システム、および体色異常の発生機序を解明した。

研究成果の概要(英文)：Flounder larvae are externally symmetric commonly to general fishes, but they transform to left-right (L-R) asymmetric body by migrating one eye to the other side of body and then differentiating chromatophores at ocular side skin. In the hatcheries for aquaculture, since abnormal pigmentation, including pigmentation of ocular side and pseudo-albinism of blind side, often appears, elucidation of the mechanism to induce abnormal pigmentation is required. This research revealed cellular and molecular systems that control L-R asymmetric skin color development in flounder, and also abnormal pigmentation

研究分野：水産学

キーワード：異体類 左右非対称 発生 色素胞分化 レチノイン酸 RNA-Seq

1. 研究開始当初の背景

ヒラメ・カレイ類は魚類一般と同じく胚発生で外見的に左右対称に発生した後、変態期に片側の眼球が体の反対側に移動し、続いて有眼側皮膚に色素胞が分化することにより体全体が左右非対称を形成する。増養殖用人工種苗では、体色の左右差形成の異常による異常(無眼側黒化、有眼側白化)が多発するため、その発生機序の解明が望まれている。

申請者らは、これまでに脊椎動物共通に内蔵の左右差を制御するノダル経路が、ヒラメ・カレイ類の眼位制御にも関与すること、種苗で発生する眼位逆位はノダル経路発現の乱れにより発生することを明らかにした。一方、体色の左右差形成の制御システムは不明のままであり、そのため体色異常の発生機序も理解されていない状況であった。

2. 研究の目的

本研究では、ヒラメ・カレイ類の体色を仔魚型の左右対称から非対称に切り替える発生制御の分子ネットワークを究明することを第一の目的とした。

さらに、ヒラメ・カレイ類種苗生産で起こる無眼側黒化および有眼側白化の発生機序を分子レベルで理解し、体色異常の防御技術の開発に結びつけることを目的とした。

これら目的の達成のために、以下の4つの項目について検討を行った。

(1) 体色の左右差形成と無眼側完全黒化

色素幹細胞から色素芽細胞を経て色素胞に至る分化のどの段階で左右差が発生するかを検討するために、幹細胞の移動経路および色素芽細胞への分化について主に左右差に着目して解析した。

ビタミンA(VA)の活性体であるレチノイン酸(RA)が無眼側黒化を誘起することが知られているので、RAが体色の左右差形成に関与している可能性を検討した。

(2) RNA-Seqによる白化関連遺伝子の探索

種苗生産では仔魚の餌として通常ユタ産アルテミアが与えられているが、ブラジル産アルテミアをヒラメ仔魚に与えると、全個体で有眼側白化が発生することが分かっている。白化は、変態初期のF期だけの給餌でも発生することから、この時期に変態期で起こる色素胞形成にとって重要な発生現象が起こっていることが推定される。この時期にブラジル産アルテミアを投与して次世代シーケンス解析を行えば、色素胞分化あるいは体色の左右差形成の上流にある遺伝子を同定できる可能性があると考え、ブラジル産およびユタ産アルテミアをF期仔魚に給餌し、次世代シーケンサーによるRNA-Seq解析で両実験区仔魚における遺伝子発現プロファイルを比較した。

(3) 変態後に起こる着色型黒化

種苗生産では、無眼側の着色型黒化(図1)がほぼ100%の稚魚に発生するが、その発生機序は不明である。黒化の防御技術開発に向けて、種苗生産で起こる着色型黒化が変態期の左右差形成の異常に起因するかどうか、また着色を起こる色素胞の起源を検討することを目的とした。

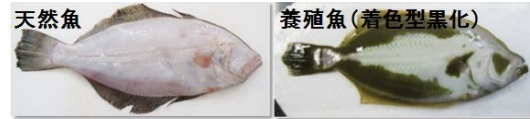


図1 天然と養殖ヒラメの無眼側皮膚の比較

(4) 魚類における概日リズムの調整機構

種苗生産では日照時間は種苗の生残や成長に深く関わり、ヒラメ種苗では24時間照明が体色異常を発生することが知られているが、光と生残・発生との関係は不明な点が多い。本研究では、体色形成に加えて、ヒラメ胚と仔魚を使って概日リズムの発生についても検討することも目的とした。

3. 研究の方法

(1) 体色の左右差形成と無眼側完全黒化

背鰭基部に分布する色素幹細胞をDilで蛍光標識し、皮膚への遊走経路を観察した。また*gch2*をマーカー遺伝子に用いたin situ hybridization (ISH)法により、遊走過程に起こる幹細胞から色素前駆細胞の分化の様子を観察した。

変態期仔魚をRAに曝露し無眼側体色への影響を解析した。また培養実験により無眼側皮膚へのRAの作用を解析した。

(2) RNA-Seqによる白化関連遺伝子の探索

変態F期ヒラメ仔魚にブラジル産およびユタ産アルテミアを5日間給餌後、それぞれの実験区で仔魚5匹からまとめてRNAを抽出し、Illumina HiSeq2000でRNA-Seq解析(100 bpペアエンド)を行った。得られた配列データを遺伝学研究所のパイプラインでアセンブルし、実験区間で発現の異なる遺伝子をスクリーニングした。候補遺伝子の発現がBA給餌により影響を受けるかどうかRT-PCRにより検証し、さらにISHで組織発現を解析した。

(3) 変態後に起こる着色型黒化

天然で変態を経て着底したヌマガレイ稚魚を仙台湾で採取し、水槽内飼育して無眼側皮膚に黒化が起こるかどうかを観察した。

黒化が始まった体長約6cmのヒラメをブアン固定後、ISHにより色素前駆細胞の分布を観察した。

(4) 魚類における概日リズムの調整機構

ISHにより、時計遺伝子*per2*の脳内発現を観察した。

in vivo 実験では、ヒラメ仔魚をLD(12:12h)、LL(24:0h)、DD(0:24h)で飼育し、

尾鰭を採取して qPCR 法で時計遺伝子 (*per2*, *per1*, *cry1*) の発現を解析した。invitro 実験では、尾鰭を LD 条件下で培養し、時計遺伝子の発現を解析した。同様の光条件下で、in vivo および invitro で、デキサメタゾン (DEX, コルチゾルのアゴニスト) を添加し、遺伝子発現におよぼす影響を解析した。

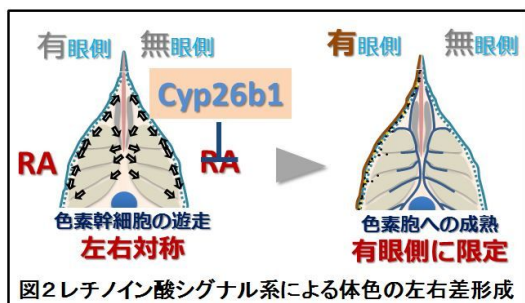
4. 研究成果

(1) 体色の左右差形成と無眼側完全黒化

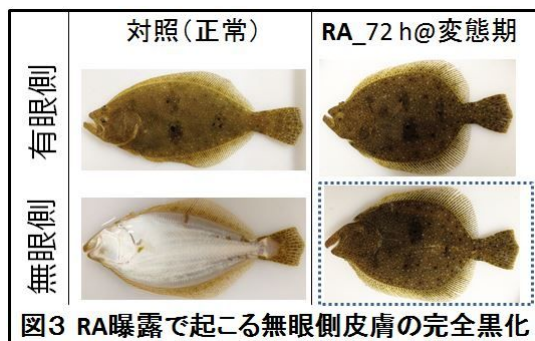
Dil を使った細胞トレース実験により、色素幹細胞は仔魚期には背鰭基部に分布し、それらは変態期に左右皮膚に遊走することが明らかになった。また培養実験では、変態期仔魚の有眼側と無眼側の皮膚を RA 存在・非存在下で培養し、RA 非存在下では無眼側皮膚片に色素前駆細胞は出現しないが、RA 存在下では 24 時間培養するだけで *gch2* 陽性の色素前駆細胞が大量に出現することが分かった。

一方、変態期には、RA 分解酵素である *cyp26b1* が有眼側皮膚よりも無眼側皮膚で高発現することが明らかになった。

以上の結果から、RA が色素幹細胞から色素芽細胞へ分化促進因子であること、また色素幹細胞の皮膚への遊走には左右差がなく、体色の左右差は、無眼側皮膚で RA 分解酵素が強発現すると、色素幹細胞から色素前駆細胞への分化が誘導されることで発生するものと結論された (図 2)。このようにヒラメ・カレイ類の体色左右差形成にレチノイン酸シグナル系が機能していることが始めて明らかになった。



変態期仔魚を RA に曝露すると、無眼側に移動した色素幹細胞も RA の刺激を受け、色素細胞に分化することになり、この場合、無眼側皮膚全体が黒化して、完全黒化が発生することが明らかになった。種苗生産で発生する黒化のうち、変態直後に既に検出できるものは、RA あるいはその前駆体である VA 過剰



によって発生することが考えられた。

(2) RNA-Seq による白化関連遺伝子の探索

RNA-Seq 解析により、ブラジル産アルテミアの給餌により発現量が有意に低下する遺伝子として 21 遺伝子がスクリーニングされ、そのうちの 6 遺伝子 (*wsb1*, *lasp1*, *bhmt1*, *hce1*, *mct1*, *neb*) が RT-PCR のレベルでも差が確認できた。

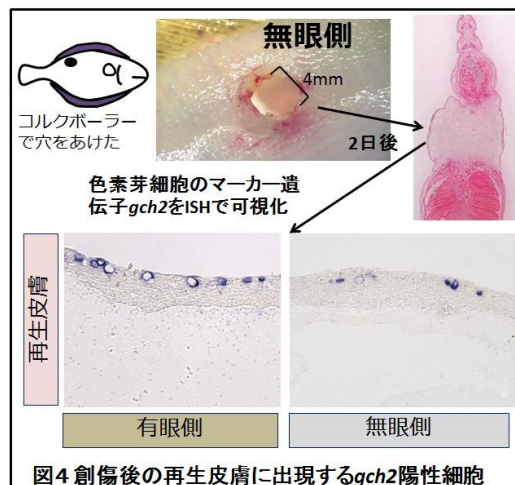
6 遺伝子について、ISH 解析により F 期仔魚で組織発現を検討した。*bhmt1* と *neb* は主に骨格筋などの横紋筋で発現し、*lasp1* は消化管を覆う平滑筋や動脈球の筋肉で発現していた。*wsb1* は脳や脊髄、*ccdc39* は嗅神経で発現が認められた。これら遺伝子は、色素幹細胞の維持や分化に機能する重要な初期応答遺伝子であることが考えられる。特に、*bhmt1* は葉酸の代謝に関わり、ヒトでは遺伝子機能の抑制がメラニン欠損を起こすことが報告されており、ヒラメでも色素形成に機能し、有眼側白化に関わっている可能性が高いと考えられる。

(3) 変態後に起こる着色型黒化

天然で変態着底したヌマガレイ稚魚も水槽飼育すると、図 1 に示したような着色型黒化黒化が発生した。従って、着色型黒化は、変態期に発生する左右差形成の異常に起因するのではなく、ヒラメ・カレイ類の無眼側皮膚には何らかの刺激により黒色素胞を分化する性質があるものと考えられた。

ホシガレイの放流では、パンチングで筋肉に穴をあけ修復した無眼側皮膚に出現する色素がマーカーとして標識に利用されている。この現象を利用して、着色型黒化を起こす色素胞の発生学的な由来を検討した。筋肉に穴をあけると 2 日後には表皮が再生され、左右の表皮の間には結合組織が形成された (図 4)。再生された表皮には色素芽細胞のマーカー遺伝子である *gch2* を発現する細胞が有眼側だけでなく無眼側の皮膚でも検出され、再生に伴って無眼側でも新しく色素形成が始まること示唆された。再生部出現する *gch2* 陽性細胞は、粘液を覆う構造を呈した。

マウスでは座骨神経を切断すると軸索を



覆うシュワン細胞が一部脱分化して、色素細胞に分化することが知られている。また粘液細胞には粘液分泌を制御するために神経が接続している。これらのことを総合すると、無眼側皮膚に着色型黒化を生じる色素胞は、粘液細胞に接する神経軸索のシュワン細胞に由来する可能性が考えられた。

(4) 魚類における概日リズムの調整機構

哺乳類では、視交叉上核が唯一の中核時計として機能し、末梢の時計遺伝子の発現リズムをオシレートしているのに対し、モデル生物である小型淡水魚のゼブラフィッシュでは、視交叉上核に中枢時計は見いだされていない。最初に視交叉上核の中核時計としての機能が脊椎動物に共通であるかを検討するために、海産大型魚類であるヒラメとカンパチで時計遺伝子 *per2* の脳内発現を観察した。両種ともに視交叉上核が昼 ON/夜 OFF の *per2* 発現リズムを示すことが示された。12 時間明期：12 時間暗期 (LD) から LL に移しても視交叉上核 (SCN) は発現リズムを維持することが明らかになり、ヒラメでは SCN が概日リズムを発信する中枢時計として機能することが示された。従って、視交叉上核の中核時計としての機能は、脊椎動物に共通であり、ゼブラフィッシュではそれが退化していることが考えられた。

尾鰭は 12 時間明期：12 時間暗期 (LD) だけでなく LL と DD でも時計遺伝子の発現に日周リズムを示したが、培養下では発現リズムと光同応答性が喪失した。しかし培地に DEX を加えると時計遺伝子の発現が正に誘導された。DEX 添加は *in vivo* においても時計遺伝子の発現を誘導した。従って、ヒラメでは体内時計の制御には階層性があり、コルチゾルが中枢時計のリズムを末梢に伝達するシグナルである可能性が推定された。

胚を LL、DD で飼育すると、SCN の概日リズム形成が抑制され、明暗の刺激が SCN の概日リズム形成に必須であることが示された。

末梢組織に、光受容タンパク質である melanopsin が発現していることを観察した。melanopsin が末梢のリズム形成に関与し、またその発現が無眼側の部分黒化と関係する可能性が推定された。

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 14 件)

茂木 淳、横井 勇人、鈴木 徹、Analyses of the cellular clock gene expression in peripheral tissue, caudal fin, in the Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, General and Comparative Endocrinology, 査読有、2017、印刷中
DOI:10.1016/j.ygcen.2017.02.009
Wu Xiaoming, Qiran Chen, 鷲尾 洋平、横

井 勇人、鈴木 徹、Excess retinoid acid induces fusion of centra by degenerating intervertebral ligament cells in Japanese flounder, Journal of Experimental Zoology, Part B, Molecular and Developmental Evolution, 査読有、326B 巻、2016、446-473

DOI:10.1002/jez.b.22717

Shen Jialing, 横田 慎平、横井 勇人、鈴木 徹、Diethylnitrosamine-induced expression of germline-specific genes and pluripotency factors, including *vasa* and *oct4*, in medaka somatic cell, Biochemical and Biophysical Research Communications, 査読有、478 巻、2016、858-863、査読有、52 巻、2016、646-653
DOI:10.1016/j.bbrc.2016.08.039

鈴木 徹、シンポジウム記録 魚類人工種苗の形態異常:これまでとこれから -1. 異体類における左右不相称異常の分子発生機構, Nippon Suisan Gakkaishi, 査読無、82 巻、2016、797

DOI:10.233/suisan.WA2320-11

横田 慎平、松野 林太、加藤 寛之、橋本 寿史、木下 政人、横井 勇人、鈴木 徹、Establishment of *oct4:egfp* transgenic and *oct4:egfp/b-actin:DsRed* double transgenic medaka lines, In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 査読有、52 巻、2016、646-653
DOI:10.1007/s11626-016-0020-6

金子 隆正、Khalid Freeha, Wu Xiaoming, 茂木 淳、宇治 督、横井 勇人、鈴木 徹、Role of notochord cells and sclerotome-derived cells in vertebral column development in fugu, *Takifugu rubripes*: histological and gene expression analyses, Cell & Tissue Research, 366 巻、2016、37-49
DOI:10.1007/s00441-016-2404-z

茂木 淳、宇治 督、横井 勇人、鈴木 徹、Early development of circadian rhythmicity in the suprachiasmatic nuclei and pineal gland of teleost, founder (*Paralichthys olivaceus*), embryos, Development Growth and Differentiation, 査読有、57 巻、2015 444-452

DOI:10.1111/dgd.12222

鷲尾 洋平、藤浪 祐一郎、清水 大輔、横井 勇人、鈴木 徹、Exposure to oxidative by-products during metamorphosis affects pigmentation patterns in flounder, *Paralichthys olivaceus*, Aquaculture, 査読有、435 巻、2015、318-327

DOI:10.1016/j.aquaculture.201410.015

茨木春美、Wu Xiaoming、宇治 督、酒井 義文、横井 勇人、鈴木 徹、Transcriptome analysis of vertebral bone in the

flounder, *Paralichthys olivaceus* (Teleostei, Pleuronectiformes), using Illumina sequencing, Marine Genomics, 査読有、24 巻、2015、269-276

DOI:10.1016/j.margen.2015.09.009

加藤 寛之、阿部 光太、横田 慎平、松野 林太、三毛門 毅、横井 勇人、鈴木 徹、Establishment of *oct4:gfp* transgenic zebrafish line for monitoring cellular multipotency by GFP fluorescence, In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal, 査読有、51 巻、2015、42-49

DOI:10.1007/s11626-014-9805-7

辰見 吉成、武田 萌、松田 勝、鈴木 徹、横井 勇人、TALEN mediated knockout zebrafish reveals the critical function of r-spondin in the fin and vertebral skeletogenesis, FEBS Letter, 査読有、588 巻、2014、4543-4550

DOI:10.1016/j.febslet.2014.10.015

〔学会発表〕(計 28 件)

茂木 淳、横井 勇人、鈴木 徹、ヒラメを使った、末梢組織の時計遺伝子発現におよぼすコルチゾルの影響の解析、平成 29 年度日本水産学会春季大会、2017 年 3 月 28 日、東京海洋大学(東京)

國政実里、横井 勇人、酒井 義文、青海忠久、鈴木 徹、給餌条件により生じるヒラメ体色異常の遺伝子発現プロファイリング解析、平成 29 年度日本水産学会春季大会、2017 年 3 月 28 日、東京海洋大学(東京)

十川麻衣、茂木 淳、横井 勇人、鈴木 徹、ヒラメ再生皮膚に現れる色素前駆細胞と色素胞の分布、平成 29 年度日本水産学会春季大会、2017 年 3 月 28 日、東京海洋大学(東京)

茂木 淳、横井 勇人、鈴木 徹、Rhythmicity of clock genes, *per2*, *per1* and *cry1*, in peripheral tissue in flounder (*Paralichthys olivaceus*), a marine teleost fish, The 22nd International Congress of Zoology, 2016 年 10 月 14 日、Okinawa Convention Center (沖縄)

茂木 淳、横井 勇人、鈴木 徹、Embryonic Development of Circadian Rhythmicity in the Suprachiasmatic Nucleus and Pineal Gland in Flounder, a Teleost Fish, International Symposium on Biological Rhythms, 2016 年 11 月 11 日、名古屋大学(名古屋)

鈴木 徹、異体類における左右性異常を発生システムと遺伝子発現から追う、平成 28 年度日本水産学会春季大会・シンポジウム「魚類人工種苗の形態異常・これまでとこれから」、2016 年 3 月 26 日、東京海洋大学(東京)

Khalid Freeha、横井 勇人、鈴木 徹、

Vitamin A metabolism, revealed by RNA-seq, in the notochord constituting intervertebral tissue, 平成 28 年度日本水産学会春季大会、2016 年 3 月 27 日、東京海洋大学(東京)

鈴木 徹、鷺尾洋平、烏 暁明、國政実里、十川麻衣、横井 勇人、ヒラメ・カレイ類の左右非対称な体色形成と着色異常の発生機構、日本動物学会第 86 回大会・第 11 回色素細胞シンポジウム；動物のからだを多様に彩るしくみ、2015 年 9 月 18 日、新潟コンベンションセンター(新潟) 鈴木 徹、國政実里、鷺 烏 暁明、十川麻衣、宇治 督、横井 勇人、Post-metamorphic ectopic pigmentation at the ocular side skin in flatfish, 48th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, 2015 年 6 月 3 日、つくば国際センター(つくば)

〔図書〕(計 1 件)

鈴木 徹、Wiley Blackwell 社、Flatfishes: Biology and Exploitation, Second Edition, Chapter 7 Development and regulation of external asymmetry during flatfish metamorphosis, 2014、171-184 ページ

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.agri.tohoku.ac.jp/bioinfor/index-j.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 徹 (SUZUKI, Tohru)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：70344330

(2) 研究分担者

酒井 義文 (SAKAI, Yoshifumi)

東北大学・大学院農学研究・准教授

研究者番号：10277361

(3) 研究分担者

横井 勇人 (YOKOI, Hayato)

東北大学・大学院農学研究・助教

研究者番号：40569729