

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：12201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26650108

研究課題名(和文) 深海魚の光受容システムと体内時計を探る

研究課題名(英文) Photosignal transduction and circadian systems in deep-sea fishes

研究代表者

飯郷 雅之 (Iigo, Masayuki)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：10232109

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：深海は極限環境であり、地球上に残されたフロンティアのひとつである。深海生物の生理や行動が日周リズムを示すかどうかは不明である。そこで、本研究では、深海魚における体内時計の存在とその特性を明らかにすることを目的に研究を進めた。

次世代シーケンサーを用いたmRNA-Seqにより網膜、脳の光受容体および時計遺伝子群の網羅的同定を試みた。その結果、コンゴウアナゴでは、2種のロドプシンと非視覚オプシンが網膜に発現することが明らかになった。色覚に關与する錐体オプシンの発現は確認できなかった。Clock, Npas2, Bmal1, Per1, Cry1, Cry2などの時計遺伝子群の部分塩基配列も同定された。

研究成果の概要(英文)：Deep sea is an extreme environment for living organisms and is one of the frontiers on the earth to be explored. Do physiology and behavior of deep sea organisms exhibit circadian rhythms? To answer this question, we analyzed photosignal transduction and circadian systems in deep-sea fishes.

We used seven species of deep-sea fish kindly supplied by JAMSTEC and Kanagawa Prefectural Marine Science High School for mRNA-seq analyses on brain and retina. We identified mRNAs encoding photosignal transduction-related genes including several opsins, G proteins, and cGMP-gated channels. Furthermore, we successfully identified several clock genes.

研究分野：時間生物学, 光ゲノム生命化学

キーワード：深海魚 光受容体 体内時計 時計遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

多くの生物に生理や行動には1日を周期とした日周リズムが見られる。日周リズムは体内時計によって制御されており、約24時間の周期で自転する地球上に生まれる昼と夜の繰り返しを進化の過程で生物が体内に取り込んで獲得した形質であると考えられている。1997年に脊椎動物の体内時計を制御する時計遺伝子が同定されて以来、体内時計に関する研究は飛躍的に進展し、現代科学で最もホット研究分野のひとつとなっている。

深海は、高水圧、低温、低栄養、低酸素、暗黒の極限環境であり、地球上に残されたフロンティアである。熱水噴出孔や鯨骨などには豊かな生態系が存在することがわかってきた。しかしながら、深海生物のサンプリングは極めて困難であることから、深海生物の生理や行動が日周リズムを示すかどうかについてはわかっていない。深海生物のバイオマスや深海生物が地球全体の生態系に与えるインパクトを正確に把握するためには、深海生物の示す日周リズムや年周リズムの理解が必須である。

## 2. 研究の目的

本研究においては、深海魚における体内時計の存在とその分子機構を、(1)光入力系、(2)体内時計の分子ネットワーク、(3)出力系の三者に分けて検討し、深海魚の体内時計の特性を明らかにする。次世代シーケンサーを用いた mRNA-Seq により、網膜、松果体および脳内光受容体の光受容体遺伝子群、および時計遺伝子群を網羅的に同定することを試みた。特に、研究代表者らが2013年に発見した新規光受容器官である血管嚢に存在する光受容体 (Nakane *et al.*, *Nature Communications* 4: 2108, 2013) に着目した。

これまでに深海生物の光受容体の分子的基盤や体内時計機能の検討はほとんどされていない。本研究は深海魚の光受容体と体内時計について総合的に検討するはじめての研究計画である。深海魚が示す生理・行動の日周リズム、季節リズムの解明や海面から入射する太陽光が深海魚に与える影響の評価から、深海に棲息する生物が地球全体の生態系に与えるインパクトを正確に把握するための基盤を確立されることが期待される。

## 3. 研究の方法

### (1) 深海魚の試料採取

2015年10月26-27日、神奈川県立海洋科学高等学校の協力のもと、相模湾の水深500メートル付近で釣りにより深海魚の漁獲を試みた。釣獲された個体から船上で採血の後、ただちに解剖し、肉眼的に松果体と血管嚢の有無を確認した。松果体、網膜、血管嚢、脳、下垂体、肝臓を採取しドライアイス上で凍結

し、宇都宮大学に運搬して以下の実験に用いた。

また、2014年4月14日に駿河湾の定置網にかかり、2014年5月6日に東海大学海洋科学博物館で公開解剖が行われたメガマウス *Megachasma pelagios* (体長4.4Mのメス) より筋肉および肝臓を採取し、ドライアイスで凍結して宇都宮大学に運搬し、以下の実験に用いた。

### (2) 海洋生物サンプルデータベースからの試料の収集

JAMSTEC が所有する船舶・潜水船等を使用して採集した「海洋生物サンプルデータベース (<http://www.godac.jamstec.go.jp/bio-sample/index.html>) において、JAMSTEC の所有する生物サンプルを検索し、遺伝子解析用の深海魚試料の提供を依頼した。本研究では、2012年6月22日 JAMSTEC の海洋調査船「なつしま」により太平洋岸北西部熱海沖水深488mで採集されたウナギ目ホラアナゴ科コンゴウアナゴ *Simenchelys parasitica* 5個体の-80℃凍結試料の提供を受け、以下の実験に用いた。

### (3) 深海魚の網膜と脳に発現する光受容体および時計遺伝子群の網羅的同定

各種深海魚の試料より total RNA を抽出し、SureSelect Strand Specific RNA Library Preparation Kit (アジレントテクノロジー) を用いて mRNA-seq 用ライブラリーを作成し、次世代シーケンサー MiSeq (イルミナ) により 250bp×2 ペアエンドシーケンスを行った。GenomicsWorkbench 7.5.1 を用いてアダプター配列をトリミングの後、*de novo* アセンブルを行った。アセンブルされたコンティグをデータベース化し、BLAST 検索により光受容体および時計遺伝子群の同定を試みた。

### (4) 次世代シーケンサーによるゲノム解析

メガマウスならびにコンゴウアナゴについては、ゲノム DNA を肝臓、筋肉、血球から抽出し、電気泳動によりクオリティーチェックを行った後、TruSeq DNA PCR-Free Sample Preparation Kit を用いてゲノム DNA ライブラリーを作成し、次世代シーケンサー MiSeq により 300bp×2 ペアエンドシーケンスを行った。上記と同様の手法でシーケンスの解析、アセンブルを行い、BLAST 検索により時計遺伝子群の同定を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) 深海魚の試料のレパートリーと眼球の大きさ、松果体と血管嚢の肉眼解剖

神奈川県立海洋科学高等学校の協力による相模湾におけるサンプリングでは、フジクジラの仲間 *Etmopterus* sp., ユメカサゴ *Helicolenus hilgendorfi*, クロシビカマス,



(3) 次世代シーケンサーによるゲノム解析  
メガマウスについては、試験的にシーケンスを行った。約 33 万リード、3.9Gb、2.8Gb、94Mb の塩基配列が得られた。すべてをアセンブルした結果、1 万 6746 本のコンティグ（全長約 6.3Mb、平均 379bp、N50=387）にアセンブルされた。これらの中には環状にアセンブルされたミトコンドリア DNA 全長（16,694bp）の塩基配列が含まれていた。リード数が少ないため、今後さらにシーケンスを加える必要がある。コンゴウアナゴについては、現在シーケンスの解析を進めている。

次世代シーケンサーを活用した mRNA-seq と全ゲノム解析を並行してさらに進め、ゲノム上のオプシンや時計遺伝子群のレパートリーを解明し、深海魚の進化適応の過程における光受容能の変化と体内時計機能の変化について考察する必要がある。今後は他の種の深海魚についてもさらに解析を進め、比較研究を進めていく予定である。

#### 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 0 件）

〔学会発表〕（計 5 件）

- ① 飯郷雅之、鈴木研太、魚類から見た体内時計の産業応用。第 21 回日本時間生物学会学術大会。2014. 11. 7-9. 九州大学(福岡)。
- ② 飯郷雅之、宇都宮大学次世代シーケンサーコンソーシアム。NGS 現場の会第四回研究会。2015. 7. 1-3. つくば国際会議場(つくば)。
- ③ 伊藤大輔、梅津輝、伊藤正倫、阿部智、青木沙織、鬼塚裕子、深田陽平、鈴木智大、飯郷雅之、次世代シーケンサーを用いた深海魚における環境情報受容体同定。第 22 回日本時間生物学会学術大会。2015. 11. 21-22. 東京大学(東京)。
- ④ 伊藤大輔、鬼塚裕子、梅津輝、深田陽平、人見愛、阿部智、伊藤正倫、青木沙織、飯郷雅之、次世代シーケンサーを用いた深海魚の環境情報受容体同定：現状と展望。第 5 回宇都宮大学オプトバイオシンポジウム。2015. 12. 21. 宇都宮大学(宇都宮)。
- ⑤ Masayuki Iigo, Expression of photosignal transduction-related genes un the saccus vasculosus. The 64th NIBB Conference Evolution of Seasonal Timers. 2016. 4. 22-24. 岡崎カンファレンスセンター(岡崎)。

〔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〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

飯郷 雅之 (IIGO, Masayuki)  
宇都宮大学・農学部・教授  
研究者番号：10232109

##### (2) 研究分担者

宮本 教生 (MIYAMOTO, Norio)  
独立行政法人海洋研究開発機構・  
海洋・極限環境生物圏領域・研究員  
研究者番号：20612237

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：