

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 16 日現在

機関番号：82708

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850127

研究課題名(和文) 魚類の左右非対称性形成機構の解明：なぜ異体類にはオモテとウラができるのか？

研究課題名(英文) Mechanism of left-right asymmetry in flounders

研究代表者

宇治 督 (UJI, SUSUMU)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・主任研究員

研究者番号：40372049

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)：本研究では、小型のヒラメ・カレイ類であるササウシノシタにおいて周年採卵技術を確認し、胚のトランスクリプトーム情報を整備し、マイクロインジェクション技術を開発し、ササウシノシタをヒラメ・カレイ類のモデル実験動物として用いていく基盤を整えた。最後に、ササウシノシタにおいてゲノム編集による左右性関連遺伝子の機能解析を試みた。

研究成果の概要(英文)：Bamboo sole has the potential to be a good model organism for understanding the developmental biology of flatfishes in general. I developed the method to get fertilized eggs all year round under laboratory conditions, collected the transcriptome information of embryo, and developed microinjection system in Bamboo sole. Finally, I tried genome editing of the genes that are thought to be related to formation of left-right axis in other organisms to elucidate the functions in Bamboo sole.

研究分野：増養殖学

キーワード：ササウシノシタ 左右性 周年採卵 形態異常 ゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

ヒラメ・カレイ類の最大の特徴は、変態時の片側眼球の移動であり、それに伴う有眼側での色素分化によって完成する体全体の左右非対称性形成である。またこの体の左右非対称性形成は、最大の特徴である一方で、種苗生産現場では最大の解決すべき問題も生じさせる。つまり異体類の種苗生産現場では、白化や黒化などの色素異常、眼が全く移動しないもしくは移動が途中で停止する、あるいは本来とは逆の方向に眼が移動する眼位異常など、体の左右非対称性形成に関連した形態異常が高頻度で発生することが問題となっている。

研究代表者らはこれまで、主にヒラメ、ホシガレイでの研究により、ヒトやマウスの内臓の左右非対称性を決定する nodal-lefty-pitx2 経路が異体類でも存在すること、左右どちらの眼が移動するかは、脳で発生する非対称形成の向きで決まること、驚くことに通常変態期に内臓の左右性決定遺伝子である pitx2 が間脳で再発現することなどを明らかにしてきた。

しかしながら、現在のところ主に使用しているヒラメは卵膜が非常に固くマイクロインジェクション法による遺伝子の機能解析ができていない。また、仮にマイクロインジェクション法でゲノム編集が可能となっても雌の成熟まで3年かかること、産卵期間が春季に限られていること、成魚が大型であり成熟、採卵、飼育に巨大な施設と膨大なコストが必要であることなど、ヒラメは実験魚としては致命的な欠点が多く、研究を効率的に進めることができていない。

そこで研究代表者は世代交代が早く、かつ小型の異体類であるササウシノシタをモデル生物として研究を行い、その結果を水産重要魚種であるヒラメ、ホシガレイ、ヌマガレイ等に応用することが効率的であり、かつ現実的であると着想した。ササウシノシタはカ

レイ目ササウシノシタ科ササウシノシタ属に属する小型(成熟最小サイズは体長約7cm)の異体類であり、天然個体の耳石と体長の関係から1年で成熟すると推定されていた。

2. 研究の目的

本研究では、ササウシノシタをモデル生物として確立するための基盤技術の整備を行うとともに、左右非対称性形成機構の解明を試みる。研究期間内には以下のことを明らかにすることを目的とした。

(1) 周年採卵技術を確立し、1年中実験可能な状況をつくる。

(2) ゲノム・cDNA 情報を整備し、左右性形成に關与する遺伝子群を解析する。

(3) 単離した遺伝子の機能解析をするためのマイクロインジェクション法を確立し、ゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 システムを用いて左右非対称性形成に關与する遺伝子の機能解析を試みる。

3. 研究の方法

(1) 人為的な低水温刺激と短日化により、通常は産卵しない冬に産卵可能かを調べた。2ヶ月間低温、短日処理を行った後、長日化および高温条件への移行を開始し1月からの採卵を試みた。コントロール区は、自然日長、自然水温の条件で飼育を行った。次に、ササウシノシタの成熟の開始に低水温または短日のどちらが必要かあるいは両方が必要かを検討することを目的に実験を行った。コントロール群では周年自然水温自然日長で採卵を行った。試験区1では、夏期に2ヶ月の低水温処理のみ、試験区2では夏期に2ヶ月の短日処理のみ、試験区3では2ヶ月の低水温と短日両方の処理を行った。その後すべての試験区で12月から徐々に長日、高温の環境条件に移行し、産卵を試みた。

(2) ゲノム・cDNA 情報を整備するため、内臓部位を取り除いたササウシノシタ稚魚を

用いてゲノム DNA を精製し、ササウシノシタ体節期胚から RNA を抽出した。精製したゲノム DNA から 800bp のライブラリーを作成し Illumina HiSeq2000 を用いてシーケンスを行った。アセンブルには DISCOVER, Velvet, ABYSS を用いて検討した。精製した RNA は Illumina HiSeq2000 を用いて PE100bp で RNA-seq 解析を行った。アセンブルには Trinity を用いた。

(3) ササウシノシタにおいて機能解析のためのマイクロインジェクションを可能にするため、受精卵の固定法、インジェクション用針の最適化、受精卵のリンガー液の最適化の検討を行った。ゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 システムを用いて左右非対称性形成に関与する遺伝子、特に southpaw, lefty, pitx2 の遺伝子機能欠損ササウシノシタの作製を試みた。

4. 研究成果

(1) 短日・低水温処理を行った試験区においてのみ通常産卵が見られない1月からの採卵が観察された。また低水温のみ、短日のみ、低水温・短日の影響について検討したところ、全水槽で産卵が確認されたものの、低水温・短日処理を行った区で最も産卵量が多く、続いて、低水温処理のみを行った区、続いて短日処理のみを行った区、そして無処理区の順となった。このことからササウシノシタでは短日および低温両要因とも成熟を促す要因であること、短日よりも低温がより成熟を促すこと、そして短日と低温は相加的に成熟に影響を及ぼすことが示唆された。以上より、低温・短日処理をすることで、ササウシノシタで最も効率的に周年受精卵を得ることが事実上可能になったと考えられた。

(2) ゲノムシーケンスの結果、約 75Gb のゲノム情報を得ることができた。これは全ゲ

ノム量の 150x 分の量に相当すると考えられる。しかしながらデータ量が膨大で単一のライブラリーのための情報のため、もっとも成績の良かった ABYSS を用いたアセンブルで最大で N50 は約 200nt しか得られなかった。一方で 20kb 以上のコンティグも多数得ることができ、一定量ではあるが使用できるゲノム情報を得ることができた。トランスクリプトーム解析の結果、53660 配列、平均 1659nt の情報を得ることができ、これらの情報からヒラメの左右形成に関与することがわかっている southpaw, lefty, pitx2 の配列を単離した。またその他に同様に左右性成形に関与することが知られている polycystic kidney disease 2(pkcd2)も単離することができた。ササウシノシタ胚からクローニングした southpaw, lefty, pitx2 遺伝子のホールマウント *in situ*法での発現解析を行い、他魚種で報告されている部位で同様の発現が確認でき、ササウシノシタにおいてもこれらの遺伝子が左右性形成に関与していることが示唆された。

(3) 受精卵の固定はピペットマンの 200ul のチップの先をカットして吸引して固定する方法が効率よくインジェクションできること、インジェクション用の針はナリシゲ製 プラーPC-10 の Heater level 80 重り 250g の設定で作成した針が、もっとも卵の生残率がよいことがわかった。またリンガー液について、アルブミンやポリエチレングルコール添加の生残率向上への影響は見られなかった。GFP の mRNA をインジェクトした個体は正常に発生孵化し、摂餌行動を示したことから、マイクロインジェクション法は開発できたと考えられた。次にササウシノシタ southpaw, pkcd2, lefty, pitx2 について crisper/cas9 のガイド RNA を作成し、ササウシノシタの 1cell~2cells のステージで Cas9 発現ベクターと共にインジェクションを行った。しかし

ながら現在のところ遺伝子の機能欠損した個体は見つかっておらず、さらなる条件の検討が必要であると考えられた。

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1件)

Chen, Q., Mogi, M., Takagi, M., Kikuchi, M., Saito, Y., Nakamura, S., Yokoi, H., Seikai, T., Uji, S., Suzuki, T. (2017) External asymmetry and pectoral fin loss in bamboo sole (*Heteromycteris japonica*): small-sized sole with potential as a *Pleuronectiformes* experimental model. *Zoological Science*, 査読有り (in press)

[学会発表](計8件)

Mogi, M., Uji, S., Yokoi, H., Suzuki, T.: Development of circadian rhythm in the suprachiasmatic nuclei in a marine fish, flounder (*Paralichthys olivaceus*) embryos. 47th Annual Meeting of the Japanese Society of Developmental Biologists, May, 2014, WINC AICHI, Aichi, Japan

宇治督・松成宏之・奥澤公一：ササウシノシタの成熟・産卵。平成26年度日本水産学会秋季大会、平成26年9月九州大学、福岡

茂木淳・宇治督・横井勇人・鈴木徹：ヒラメ視交叉上核及び松果体での概日リズムの発生。平成26年度日本水産学会秋季大会、平成26年9月九州大学、福岡

茂木淳・宇治督・横井勇人・鈴木徹：ヒラメ視交叉上核での分子時計の初期発生。日本動物学会第85回大会 平成26年9月 東北大学、宮城

茂木淳・宇治督・横井勇人・鈴木徹：ヒラメ視交叉上核での概日リズムの発生。

第37回日本分子生物学会年会、平成26年11月 パシフィコ横浜、神奈川県

Suzuki, T., Kunimasa, M., Wu, X., Togawa, M., Uji, S., Yokoi, H.: Post-metamorphic ectopic pigmentation at the ocular side skin in flatfish. 48th annual meeting of the Japanese society of Developmental Biologists, June, 2015, Tsukuba International Congress Center, Ibaraki, Japan

宇治督・松成宏之・奥澤公一：ササウシノシタにおける周年採卵技術開発の試み。平成28年度日本水産学会秋季大会、平成28年9月 近畿大学、奈良
宇治督・松成宏之・奥澤公一：ササウシノシタ採卵に係る温度・日長の影響解析。平成29年度日本水産学会春季大会、平成29年3月 東京海洋大学、東京

6. 研究組織

(1)研究代表者

宇治 督 (UJI SUSUMU)

国立研究開発法人水産研究・教育機構・増養殖研究所・主任研究員

研究者番号：40372049