

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 16 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870824

研究課題名(和文)イトヨにおける異なる日長応答性の進化とその遺伝基盤

研究課題名(英文) Genetic and molecular basis underlying divergence in photoperiodic response in stickleback ecotypes

研究代表者

石川 麻乃 (Ishikawa, Asano)

国立遺伝学研究所・集団遺伝研究系・助教

研究者番号：20722101

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)：海型では短日から長日への移行時に甲状腺刺激ホルモン(TSHb2)の発現が下がる一方、淡水型ではこの日長応答性が失われている。TSHb2ノックアウトイトヨの解析より、TSHb2は冬に精巣発達や体サイズの成長を抑制する機能を持つと考えられた。また、TSHb2の日長応答性の喪失は北米ではシス制御領域の変異で、日本ではトランス因子の変異で生じてきたと示唆され、その発現誘導に関わる候補転写因子を得た。

研究成果の概要(英文)：Although loss of seasonality has been found throughout the animal kingdom, we know little about its molecular and genetic mechanisms. We are addressing this question using marine and stream ecotypes of sticklebacks. To investigate the mechanisms underlying the divergence in photoperiodic responses between the ecotypes, we conducted microarray analysis and found that photoperiodic response of TSHb2 gene was lost in stream. Reduction of TSHb2 response was found in two independently derived stream populations from Japan and Canada. TSHb2-knockdown fish showed that TSHb2 suppresses LH and FSH expressions and testis development under short days. In the Canada, cis mutations contributed to the loss of TSHb2 response, whereas in Japan it was highly polygenic. Genome sequencing revealed several mutations at the cis region of the Canadian stream TSHb2 locus. RNAseq of pituitary revealed several transcription factors that show expression changes immediately after the photoperiodic shift.

研究分野：進化

キーワード：日長応答性 甲状腺刺激ホルモン

## 1. 研究開始当初の背景

「表現型可塑性」は、同一ゲノムから環境に応じて異なる表現型を生じる現象であり、環境適応や進化に重要な役割を果たすとされている。表現型可塑性の能力には集団間で変異があり、この変異は、環境の変動性の違いなどに応じて適応的に進化してきたと考えられているが、その具体的な進化遺伝基盤についてはほとんど明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、種内に海型と淡水型という生活史多型を持つトゲウオ科魚類イトヨを用い、日長応答性の集団間変異をもたらす分子遺伝機構を解明する。研究代表者らの研究から、祖先的な海型から派生した複数の淡水型で、日長条件に対する *TSHb2* などの遺伝子応答性が、平行的に、しかし異なる遺伝機構で失われていることが示唆されてきた。そこで、① *TSHb2* の日長応答性の平行的喪失をもたらした具体的な分子遺伝基盤を複数のイトヨ集団で解明し、比較するとともに、②イトヨの生活史における *TSHb2* の機能解析を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) *TSHb2* 発現量の全ゲノム expression QTL (eQTL) 解析

*TSHb2* の発現レベルを量的形質とみなし、その発現に影響を及ぼすゲノム上の領域を特定する eQTL (Expression Quantitative Trait Locus) 解析を行った。解析には短日条件下での北米の海型と淡水型の F2 交雑個体 200 匹と、日本の海型と淡水型のバッククロス個体 190 匹の下垂体サンプルから行った。下垂体から RNA を抽出し、qRT-PCR によって *TSHb2* の発現量を解析した。また、対応する F2 交雑個体のヒレから DNA を抽出し、研究代表者らのデザインした GoldenGate SNP アッセイもしくは RAD-seq により遺伝型を決定し、R/QTL を用いて eQTL 解析を行った。

### (2) *TSHb2* 上流の候補変異領域を用いたレポーターアッセイ

北米産の淡水型で得られた上流候補領域の哺乳類培養細胞を用いて Promega 社のデュアルレポーターアッセイシステムによるレポーターアッセイを行った。

### (3) *In situ* hybridization による下垂体における *TSHb2* の発現局在解析

*TSHb2* の DIG 標識 RNA プロブ合成し、短日条件下での海型と淡水型、長日条件下での海型の下垂体での *TSHb2* の発現局在を調べた。下垂体は 4%PFA で固定し、パラフィン切片を作成した。

### (4) 日長変化に伴って下垂体で早期に発現変動する転写因子の解析

日長変化に伴い、*TSHb2* に先んじて発現誘導される転写因子をスクリーニングするため、

長日へ移行した直後の海型イトヨの下垂体の RNAseq を行う。研究代表者のこれまでの研究より、長日条件に移行して 1 日目以下垂体での *TSHb2* の日長応答が見られることが分かっている (Ishikawa et al. unpublished)。また先行研究より、日長変動に対するイトヨの感受期は明期開始後 6~10 時間とされている。そこで、短日条件で数ヶ月飼育した海型を長日条件に移し、明期開始から 4 時間おき以下垂体のサンプリングを行った。この下垂体から RNA を抽出し、Clontech 社の微量 RNA 用の cDNA 調整キットと illumina 社の次世代シーケンサー用 cDNA ライブラリー調整キットによって cDNA ライブラリーを合成し、HiSeq2000 を用いて RNAseq を行った。参照配列へのマッピングは CLC Genomics Workbench を用いた。

(5) Single cell RNA seq を用いた海型の下垂体で *TSHb2* と共発現している転写因子の探索 *TSHb2* と共発現している転写因子の探索を行うために、Fluidigm の C1 システムを用いた、1 細胞 RNA シークエンスを行った。短日条件下においた海型の下垂体を取り出し、トリプシン処理によって 1 細胞ずつに分け、C1 array for mRNAseq と C1 Single-Cell Auto Prep Kit for mRNA Seq、SMARTer Ultra Low RNA Kit for the Fluidigm C1 System 2 を用いて cDNA ライブラリーを合成し、HiSeq2000 を用いて RNAseq を行った。参照配列へのマッピングは CLC Genomics Workbench を用いた。

### (6) ゲノム編集技術を用いた *TSHb2* ノックアウトイトヨの作成と機能解析

*TSHb2* の機能解析を行うために、TALEN を用いたノックアウトイトヨを作成した。日本の海型の受精卵を用いて *TSHb2* コンストラクトをインジェクションし、F0 個体を成体まで育て、短日条件下での体サイズ、生殖腺重量、酸素消費量、性腺刺激ホルモンの発現量を解析した。

## 4. 研究成果

(1) *TSHb2* の日長応答性の平行的喪失をもたらした具体的な分子遺伝基盤を複数のイトヨ集団で解明し、比較した

まず、北米集団と日本集団を用いて短日条件下での *TSHb2* 遺伝子発現レベルの eQTL 解析を行った結果、北米集団では *TSHb2* 発現レベルの違いは *TSHb2* 遺伝子座自体に存在するのに対して、日本集団ではそのような遺伝子座は見いだせなかった。これは、北米集団での *TSHb2* 遺伝子の日長応答性の違いは cis 制御領域の違いにより、日本集団のそれは trans 因子によって決定しているという研究代表者のこれまでの研究成果と一致する。更に、北米と日本の海型と淡水型を含めた複数集団の全ゲノムリシーケンシング配列から、

*TSHb2* の cis 制御領域に北米の淡水型のみに見られる欠失配列が発見されたことから、この領域が北米の淡水型で日長応答の喪失をもたらした候補領域と考えられた。この領域を用いてレポーターアッセイを行ったところ、海型と淡水型の *TSHb2* の上流配列は異なる発現誘導能を持っていることが示された。また、*TSHb2* の日長応答性の発現誘導に関わる候補転写因子をスクリーニングするために、短日条件から長日条件に移行した後、4 時間おきにサンプリングした下垂体を用いて RNAseq を行い、*TSHb2* よりも早期に発現変動を示し、*TSHb2* の cis 制御領域に結合する可能性のある幾つかの候補転写因子が得られた。また、海型、淡水型の下垂体で *TSHb2* の in situ hybridization を行い、*TSHb2* は短日条件下の海型の下垂体の非常に少数の細胞で強く発現している一方、長日条件下や淡水型では発現していないことを見出した。また、そこで、海型の下垂体を用い single cell RNA シークエンスを行い、*TSHb2* と共発現している転写因子の探索を行い、*TSHb2* に対して日長条件の情報を与える幾つかの候補転写因子を得た。今後は、イトヨで培養細胞系を立ち上げ、*TSHb2* の発現がこれらの転写因子によって誘導されるか、また、淡水型で見られる *TSHb2* の上流配列の欠失によりその誘導能が変化するかを解析する必要がある。

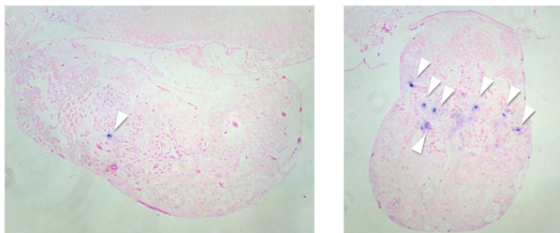


図 1：短日条件下の海型の下垂体での *TSHb2* 発現細胞

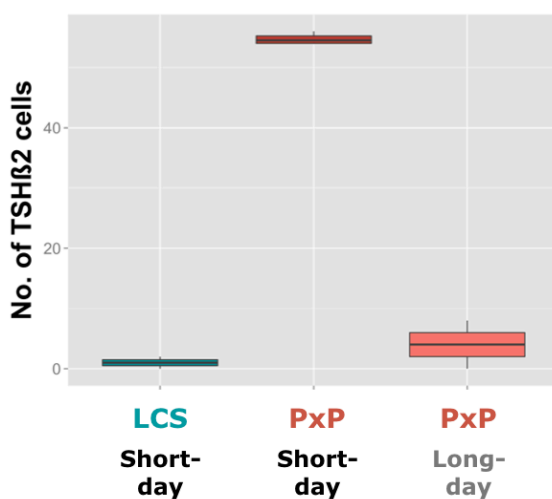


図 2：短日条件下の海型、淡水型、長日条件下の海型での *TSHb2* 発現細胞数

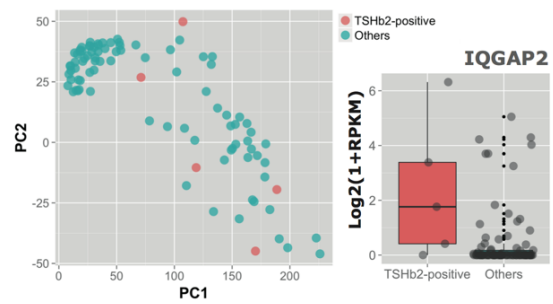


図 3：Single cell RNA シークエンスで得られた下垂体細胞の発現プロファイルの PCA 解析 (左) と *TSHb2* と共発現する上流候補転写因子 (右)

(2)イトヨの生活史における *TSHb2* の機能解析を行った

*TSHb2* は短日条件の海型で高いことから、TALEN 法により *TSHb2* ノックアウト海型イトヨを作成し、短日条件での表現型や遺伝子発現を解析した。生殖腺 (精巣/卵巣) 発達、体サイズ、呼吸量を解析したところ、雌雄両方で体サイズが上昇し、雄では精巣が成熟していた。短日条件で海型と淡水型を比べると、海型の方が体サイズが抑制され、また雄の精巣発達も著しく抑制されているため、短日条件での海型の高い *TSHb2* 発現量は体サイズの成長や生殖腺の発達を抑制していると考えられた。*TSHb2* のノックアウトがどのような下流の遺伝子発現に影響し、このような表現型を引き起こしているのか探るために、*TSHb2* ノックアウトイトヨとコントロールイトヨを用いて短日条件での脳の RNA シークエンスと、下垂体での生殖腺刺激ホルモン遺伝子の発現量の qRT-PCR を行った。すると、脳では、近年、摂食量に寄与することが知られてきた *POMC1* の発現が上昇しており、また下垂体では生殖刺激ホルモンが上昇していたことから、*TSHb2* は短日条件でこれらの遺伝子発現を抑制していると考えられた。今後は、*TSHb2* の摂食行動や内分泌機構に与える影響を行動実験やメタボローム解析により詳細に解析する予定である。



図 4：*TSHb2* ノックアウトイトヨで見られる体重の上昇

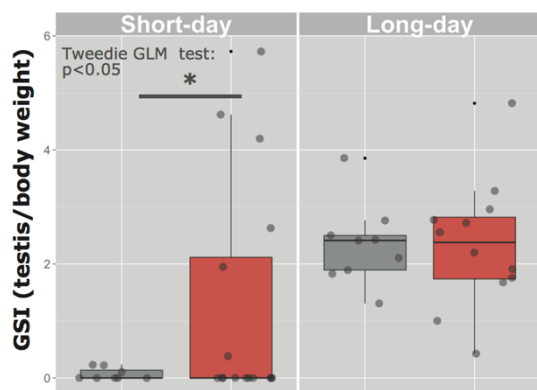


図5：TSHb2 ノックアウトイトヨで見られる精巣発達

## 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3件)

- (1) Ishikawa A, Kusakabe M, Kume M, and Kitano J. Comparison of freshwater tolerance during spawning migration between two sympatric Japanese marine threespine stickleback species. *Evolutionary Ecology Research* (2016) in press
- (2) Ravinet M, Ishikawa A, and Kitano J. Trophic niche differentiation and phenotypic divergence among cryptic species of Japanese ninespine stickleback. *Evolutionary Ecology Research* (2016) in press
- (3) Yamahira K, Mochida K, Fujimoto S, Mokodongan DF, Montenegro Gonzalez JA, Kaito T, Ishikawa A, Kitano J, Sue T, Mulis Hadiaty RK, Mandagi IF, Masengi AKW. New localities of the *Oryzias wovora* species group (Adrianichthyidae) in Sulawesi Tenggara. *Indonesian Journal of Ichthyology* (2016) in press

〔学会発表〕(計6件)

- (1) 石川 麻乃、日下部 誠、吉田 恒太、Mark Ravinet、牧野 能士、豊田 敦、藤山 秋佐夫、北野 潤「トランスクリプトーム進化の環境依存的制約」第63回日本生態学会 (in Japanese)、H1-03、2016年3月20-24日、仙台
- (2) [招待講演] 石川 麻乃、北野 潤「トゲウオ科魚類イトヨにおける季節性繁殖の平行的な喪失とその遺伝基盤」第22回日本時間生物学会学術大会 (in Japanese)、シンポジウムV「時間生物学のニューフロンティアを探る」2015年11月22日、東京
- (3) [招待講演] 石川 麻乃「トゲウオ科魚類イトヨにおける季節性繁殖の平行的な喪失とその分子遺伝基盤」進化群集生態学シンポジウム 2015 (in Japanese)、2015年9

月25日、京都

- (4) 石川 麻乃、北野 潤「DHAが担う新規環境への適応放散」第16回日本進化学会大会 (in Japanese)、W11 ワークショップ「『飼う!』進化学」、2015年8月20-23日、東京
- (5) [招待講演] 石川 麻乃「トゲウオ科魚類イトヨにおける季節性繁殖の平行的な喪失とその分子遺伝基盤」ユニークな少数派実験動物を扱う若手が最先端アプローチを勉強する会 (in Japanese)、2015年8月18-19日、東岡崎
- (6) Ishikawa A, and Kitano J. "Does a DHA synthesis gene play a key role in stickleback freshwater colonization?" Stickleback 2015, Eighth International Conference on Stickleback Behavior and Evolution, July 26-31, 2015, Stony Brook, USA

〔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

石川 麻乃 (ISHIKAWA, Asano)

国立遺伝学研究所・集団遺伝研究系・助教

研究者番号：20722101