公開

研 究 終 了 報 告 書

「柔軟性と頑健性を備えた季節温度適応能の分子基盤の解明」

研究期間: 2021 年 10 月～2024 年 3 月
研 究 者: 中山 友哉

1． 研究のねらい

地球温暖化は地球全体で気候変動を引き起こし、その影響によって海洋生態系を構成する多くの外温動物の生存基盤が揺るがされている。特に地球温暖化によって引き起こされている水温の変化は外温動物の生理機能や行動へ深刻な影響を及ぼしているが、内温動物と比べて外温動物の温度適応機構は研究が進んでおらず、その分子機構は未解明のままである。

地球温暖化による気候変動は人為的なものとされるが、季節が存在する温帯では元来大きな環境変動が繰り返されている。そのため、温帯に生息する多くの動物は環境に応じて柔軟に生物機能を変化させる「柔軟性」や、環境に依らず生物機能を発揮できる「頑健性」を備えた環境適応能力を持つことが多い。生物学の発展に寄与してきたモデル動物であるメダカ（*Oryzias latipes*）もその一つであり、0°C から 40°C と魚類の中でも突出した広さの温度域に適応可能である。また、その温度適応能を季節に合わせて柔軟に変化させることで温帯の環境に適応していることが知られている。しかし、メダカが持つ広範囲な温度適応能を可能にしている遺伝的基盤や、温度適応能の季節変化を司る分子基盤は明らかとなっていない。そこで、本研究ではメダカが持つ柔軟性や頑健性に優れた温度適応能に着目し、その分子基盤を明らかにすることを目的とした（図 1）。また、これらの研究を通して海洋生態系の保全技術や気候変動への適応策を開発するための基礎的知見を得ることを目的とした。

公開

2. 研究成果

（1）概要

研究代表者は、優れた温度適応能を有するメダカに対して次世代シークエンサーやゲノム編集、AI などを適用することで、データ駆動型の研究を展開してきた。その結果、これまで大きく 2 つの研究成果を得ることができた。1 つ目は AI による魚類の温度耐性評価系の確立である（図 1 左下）。ACT-X「AI 活用学問革新創成」の長谷川達人准教授と共同研究を行い、AI を用いた魚類の温度耐性評価系を確立した。この評価系は、深層学習によってトレーニングした情報をもとに魚体が平衡感覚を喪失したタイミング（温度変化に耐えられなくなった時間）を自動で定量する系である。これまで数時間にわたる動画を人間が目で見て判断していたが、自動化ができたことにより、魚類の温度耐性をより正確に効率よく定量することが可能となった。また、この評価系を用いることで、メダカ近交系や近縁種が異なる温度耐性を有していることも明らかにすることができた。現在、温度耐性が異なるメダカ近交系やその近縁種の比較解析を行う準備を進めており、温度耐性の差を生み出す遺伝的変異を同定する予定である。2 つ目は、冬の低温適応に必須な分子の発見である（図 1 右下）。温度を変化させた際の RNA-seq の時系列データとゲノム編集を用いた表現型スクリーニングを組み合わせた解析によって、特定の転写因子（以降、*tf1*）を欠失させたメダカは、低温下における生存率が著しく低下することを発見した。この結果は、*tf1* が低温適応において必須の役割を果たしていることを示している。これまで次世代シークエンサーの普及により温度に応答する遺伝子の探索は様々な種において数多くなされてきたが、どの遺伝子が温度適応に決定的な役割を果たしているか不明のままであった。そのため、*tf1* の発見は魚類の温度適応機構の理解を大きく前進させる可能性があり、今後 *tf1* を起点とした研究を展開することで、魚類のみならず、地球温暖化によって生存が危ぶまれている外温動物の温度適応機構の理解にもつながることが期待される。

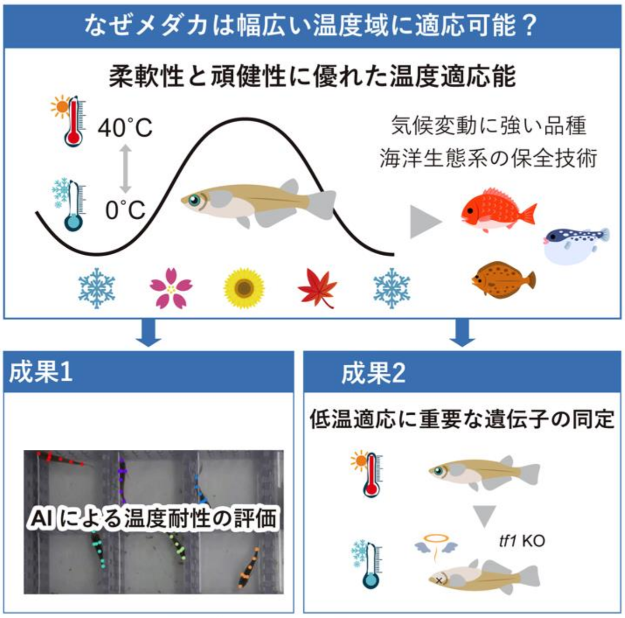

図 1. 本研究の目的とこれまでの成果

公開

（2）詳細

研究テーマ A「メダカ近交系を用いた遺伝学的解析」

メダカは高精度なゲノム情報が整備されているだけでなく、魚類の中でも遺伝背景が異なる近交系が多数作出されている。近交系間で温度耐性が異なるのであれば、遺伝学的解析により、温度耐性の強さを決定する遺伝子に迫れると着想した。そこで、まず魚類の温度耐性を評価する実験系を確立することとした。温度耐性の一般的な評価方法として水温を変化させた際に個体の平衡感覚を喪失するまでの温度や時間を指標に温度耐性を評価する臨界温度試験法がよく知られている。しかし、平衡感覚の喪失のタイミングは観測者の判断によるものであるため、より正確な定量を行うことを目的として、ACT-X「AI 活用学問革新創成」の長谷川達人准教授との共同研究を行い、AI を用いた魚類の温度耐性評価系を確立した（図 2）。この評価系は、深層学習によってトレーニングした情報をもとに魚体が平衡感覚を喪失したタイミング（温度変化に耐えられなくなった時間）を自動で定量することができるため、正確に効率よく、魚類の温度耐性を評価することが可能となった。そこで、この系を用いて、10 種類のメダカ近交系の温度耐性を評価したところ、近交系間で異なる温度耐性を持つことが明らかとなった。現在、これら近交系を用いて量的形質遺伝子座（QTL）解析を実施するため、温度耐性の異なる近交系間で交配を行っている。

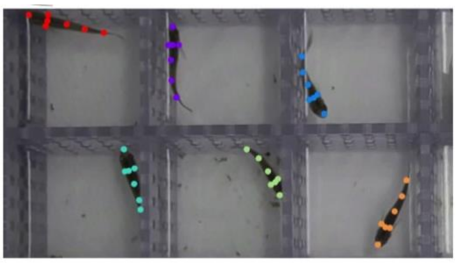

図 2. AI による温度耐性評価の自動化

研究テーマ B「温度適応能の季節変化の分子基盤の解明」

四季が明瞭な温帯では、季節によってダイナミックな温度変化が起きる。そのため、温帯に生息する外温動物は非常に幅広い温度域に適応可能である。また、夏は高温耐性、冬は低温耐性のようにその温度適応能は季節によって変化するが、温度適応能の季節変化を司る遺伝子制御ネットワークは明らかとなっていない。そこで、温度を変化させた際の時系列試料を用いた網羅的な遺伝子発現解析を実施し、温度適応能の季節変化を司る遺伝子制御ネットワークを明らかにすることとした。26°C の水温を基準として、8°C もしくは 34°C へと移行し、水温移行後 0 日目、1 日目、3 日目、7 日目、14 日目の計 5 タイムポイントの組織（脳、肝臓、鰓、心臓、筋肉）の時系列試料を用いた RNA-seq 解析を実施した（図 3）。その結果、数百から数千に及ぶ遺伝子が低温もしくは高温によって発現変動することが明らかとなり、それぞれを低温応答遺伝子（Cold responsive genes; CRG）、高温応答遺伝子（Heat responsive genes; HRG）と定義した。興味深いことに、CRG と HRG に含まれる遺伝子の内訳は大きく異なり、その多くが低温のみもしくは高温のみで応答する遺伝子であった。次に、CRG や HRG の多くの発現制御に重要な遺伝子を絞り込むため、転写因子に着目して同時系列データのネットワーク解析を実施した。その結

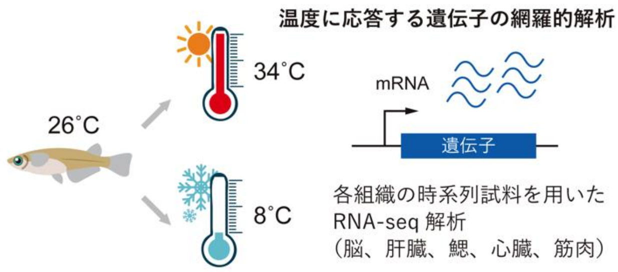

図3. 本研究で実施したRNA-seq解析の実験デザイン

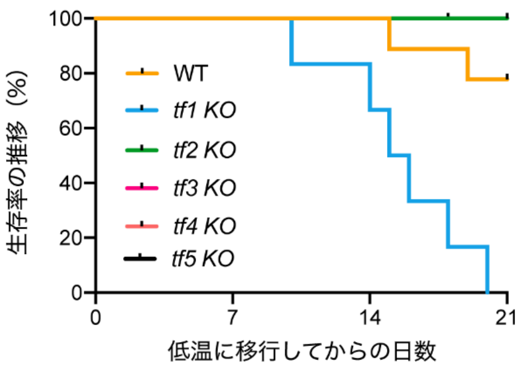

図4. 低温に移行した際のKOメダカの生存率

果、各組織においてネットワークのハブとなる転写因子を抽出することに成功した。つまり、これら転写因子が CRG や HRG の発現制御に重要である可能性が示唆された。そこで、候補転写因子の低温下や高温下の機能を明らかにするべく、ゲノム編集による機能解析を実施した。通常のゲノム編集では掛け合わせが必要なため、ノックアウト（KO）メダカを作製するには多くの労力と時間がかかるが、この障壁を乗り越えるため、交配を必要とせず、G_0 世代で全身性の KO が作出できる Triple-target CRISPR 法（Kroll et al., 2019; Quick et al., 2021）を用いて各転写因子の KO を作製した。その結果、*tf1* を KO したメダカは低温下における生存率が著しく低下することが明らかとなった（図 4）。この結果は、*tf1* が低温適応において非常に重要な役割を果たしていることを示しており、たった 1 つの遺伝子の操作によって魚類の温度適応能が制御できることを示唆している。しかし、*tf1* KO メダカがなぜ低温下で死んでしまうのかは不明のままであった。そこで、現在この謎を明らかにすべく、*tf1* の KO メダカを用いた RNA-seq 解析や ChIP-seq 解析、質量分析装置を用いた解析を実施する準備を進めている。これらの実験により、*tf1* が制御する情報伝達経路および低温下での機能の詳細が明らかになる予定である。また、高温の RNA-seq データを用いた解析によって絞り込まれた候補遺伝子の機能解析についても現在鋭意進行中である。そのため、近い将来高温適応に重要な遺伝子も明らかになることが期待される。

3.　今後の展開

本研究により、*tf1* が低温適応に重要な役割を果たしていることが明らかとなったが、*tf1* KO メダカがなぜ低温下で死んでしまうかは不明のままである。そのため、今後 1 年間かけて、KO メダカを用いた RNA-seq 解析や ChIP-seq 解析、質量分析装置を用いた解析を実施し、*tf1* が制御している情報伝達経路や *tf1* が制御している生理機能を明らかにする。なお、*tf1* KO メダカは既に確立できているため、数が揃い次第、上記実験を順次行っていく予定である。また、高温の RNA-seq データを用いた解析によって絞り込まれた候補遺伝子の機能解析についても現在鋭意進行中である。そのため、近い将来高温適応に重要な遺伝子も明らかになることが期待され、その遺伝子を起点とした研究を展開することで、低温だけでなく、高温の適応機構の理解も大きく前進することが期待される。これまで次世代シークエンサーの普及により温度に応答する遺伝子の探索は様々な種において数多くなされてきたが、どの遺伝子が温度適応に決定的な役割を果たしているか不明のままであったため、本研究を通して、魚類の温度適応機構の理解が大きく前進することが期待される。また、これらの知見に基づいて、魚類の温度適応能を制御する技術を開発することで、気候変動問題など人類が抱えている最重要課題の解決に貢献することが期待される。

公開

4.　自己評価

研究目的の達成状況

本研究において優れた温度適応能を有するメダカをモデルとした研究を展開することで、外温動物の温度適応の分子基盤の一端が見えてきた。その中でも、数百から数千個に及ぶ温度応答遺伝子の中から、低温下での生死に影響を及ぼす *tf1* を発見することができたのは、本研究の特筆すべき成果だと考える。この結果は、*tf1* が低温適応において必須の役割を果たしており、たった 1 つの遺伝子の操作によって魚類の温度適応能を制御できる可能性を示唆している。また、低温だけでなく、高温についても着目し、高温適応に重要と考えられる候補遺伝子をいくつか絞り込むことにも成功した。本研究は ACT-X から始めた研究プロジェクトであるが、2.5 年間と短い研究期間の中で、魚類の温度適応に決定的な役割を果たしている 1 つの遺伝子に辿り着けたなど、当初予想していた以上の進展を得ることができた。

研究の進め方

上述の通り、RNA-seq 解析を用いた研究は当初の予想以上の進展を得られた一方、もう一つの計画である「メダカ近交系を用いた遺伝学解析」は、実験予定個体の死亡などが原因で、解析に遅れが生じた。その関係もあって、使用予定であった費用を次年度に後ろ倒しにするなどの対応が必要であった。一方で、予算を割り当てる実験内容の変更やエフォートの割合などを適材適所柔軟に対応し、研究を進めることで、上述の成果を得ることができた。遅れが生じていた「メダカ近交系を用いた遺伝学解析」についても、現在も並行して研究を進めているため、近い将来一定の成果が得られる予定である。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

これまで次世代シークエンサーの普及により温度に応答する遺伝子の探索は様々な種において数多くなされてきたが、どの遺伝子が温度適応に決定的な役割を果たしているか不明のままであった。そのため、*tf1* の発見は魚類の温度適応機構の理解を大きく前進させる可能性があり、今後 *tf1* を起点とした研究を展開することで、魚類のみならず、地球温暖化によって生存が危ぶまれている外温動物の温度適応機構の理解にもつながることが期待される。本研究で得られた知見は、魚類の温度適応能を人為的に制御する技術の開発へとつながる可能性があり、水産有用種において気候変動に強い品種を作出することで、気候変動問題や食料問題の解決に貢献することが期待される。

公開

5.　主な研究成果リスト

（1）代表的な論文（原著論文）発表

研究期間累積件数：2件

1. **<u>Tomoya Nakayama</u>**, Fuka Hirano, Yuki Okushi, Kousuke Matsuura, Akiko Matsumiya, Takashi Yoshimura. Orphan nuclear receptor *nr4a1* regulates winter depression-like behavior in medaka. *Neuroscience Letters* 814, 137469 (2023). 査読有.
季節による温度変化によってメダカの行動は大きく変化するが、その分子機構は明らかとなっていなかった。本論文では、ゲノム編集技術を用いることで、冬に観察されるうつ様行動の制御に核内受容体である *nr4a1* が関与していることを明らかにした。
2. **<u>Tomoya Nakayama</u>**, Miki Tanikawa, Yuki Okushi, Thoma Itoh, Tsuyoshi Shimmura, Michiyo Maruyama, Taiki Yamaguchi, Akiko Matsumiya, Ai Shinomiya, Ying-Jey Guh, Junfeng Chen, Kiyoshi Naruse, Hiroshi Kudoh, Yohei Kondo, Honda Naoki, Kazuhiro Aoki, Atsushi J. Nagano, Takashi Yoshimura. A transcriptional program underlying the circannual rhythms of gonadal development in medaka. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.* 120(52), e2313514120 (2023). 査読有.
約 1 年の周期のリズムを刻む概年リズムの分子機構は明らかとなっていなかったが、本論文では自然条件件下および恒常条件下で飼育したメダカの脳を用いたトランスクリプトーム解析を実施することで、内因性の体内時計によって駆動されている概年遺伝子を世界で初めて明らかにした。

（2）特許出願

研究期間全出願件数：0 件（特許公開前のものも含む）

（3）その他の成果（主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等）

主要な学会発表

[1]　中山友哉，鹿島誠，成瀬清，吉村崇．メダカの季節温度適応におけるトランスクリプトーム解析．令和 5 年度日本水産学会春季大会. 2023 年 3 月 30 日.

[2]　中山友哉，鹿島誠，成瀬清，吉村崇．Transcriptome analysis of the low temperature response in fish using medaka as a model. 第 70 回日本生態学会大会. 2023 年 3 月 18 日.

[3]　中山友哉．メダカから明らかとなった動物の季節適応戦略の分子基盤．生物リズム若手研究者の集い 2022. 2022 年 12 月 5 日.（招待講演）

[4]　中山友哉，吉村崇．メダカから探る魚類の季節適応機構．日本動物学会　第 93 回早稲田大会. 2022 年 9 月 9 日.（招待講演）

著作物

[1]　中山友哉，吉村崇．メダカに学ぶ脊椎動物の冬季適応戦略．低温科学　81，61-70 (2023).