

## 論文審査の結果の要旨および担当者

報告番号	第	号
------	---	---

氏 名 丸山 迪代

論 文 題 目

メダカをモデルとした脊椎動物の温度による季節適応機構の解明

### 論文審査担当者

主 査	名古屋大学教授	吉村 崇
委 員	名古屋大学教授	山本 直之
委 員	名古屋大学教授	一柳 健司
委 員	名古屋大学准教授	大川 妙子
委 員	名古屋大学助教	塚田 光

## 論文審査の結果の要旨

熱帯以外の地域に生息する生物は、季節に合わせて生理機能や行動を変化させることで、厳しい環境の季節変化に適応している。こうした季節適応の一つとして、毎年決まった季節に繁殖活動がみられる季節繁殖が知られている。季節繁殖は親世代が妊娠・孵卵期間を逆算することで、気候が穏やかで食料が豊富な季節に次世代が生育できる生存戦略である。多くの生物は日長や温度の情報を手がかりとして季節を感知している。日長を季節変化の手がかりとして生理機能を変化させる光周性のしくみは古くから研究されており、当研究室のウズラ (*Coturnix japonica*) を用いた先行研究により、その一連の分子メカニズムが明らかにされてきたが、温度の情報を手がかりとして動物が季節に適応するしくみについては、ほとんど明らかになっていない。

本研究では、脊椎動物の温度による季節適応のしくみを明らかにすることを目的として、メダカ (*Oryzias latipes*) をモデルとして用いた。メダカは春から夏になると生殖腺を発達させ、ほとんど毎日のように繁殖活動を行う。反対に秋から冬の時期は生殖腺を退縮させ、繁殖活動を停止する。これらの季節応答は実験室でも日長と温度を制御することで再現できるため、メダカは季節適応の研究を行う上で優れたモデルである。これに加え、日本の様々な地域の集団をもとにつくられた系統がナショナルバイオリソースプロジェクト (NBRP) で保存されている。

当研究室における先行研究の結果から、異なる地域に由来するメダカの2系統「東通」(Hi) と「花巻」(Ha) は、冬を模した短日低温条件から春を模した長日温暖条件に移して飼育した際、生殖腺が発達し始める日長条件や温度条件が異なることが明らかになった。季節応答を示す生物において、日長や温度を変化させたときに生理機能が大きく変化する「臨界日長」や「臨界温度」の存在が知られており、季節適応機構の中で中心的な役割を果たす。先行研究で用いた2系統のうち、Hi は14時間明期 18 °C (14L/18 °C) では生殖腺を発達させず、温度が2 °C だけ高い14L/20 °C の条件になると生殖腺の著しい発達がみられた。このことから、Hi では18 °C と20 °C の間に臨界温度が存在していることが明らかになった。一方のHa は、Hi で生殖腺が発達しなかった14L/18 °C の条件で生殖腺の発達がみられたことから、Hi よりも低い臨界温度を持つと考えられた。これら先行研究の結果から、14L/18 °C での生殖腺の発達状態において明瞭な差がみられるHi とHa を用いて順遺伝学的解析を行うことにより、臨界温度の決定に重要な遺伝子を同定できると考えた。

本研究ではまず、Hi とHa の2系統の交配により作出した交雑第2世代 (F<sub>2</sub>) の集団を14L/18 °C の条件で飼育し、生殖腺重量指数 (GSI) の値を指標として生殖腺の発達状態を調べた。この結果、F<sub>2</sub> ではHi と同様にGSIの値が小さい個体からHaと同様に大きい個体まで様々な表現型を示す個体が出現した。次に、交配に用いた親系統と実験に用いたF<sub>2</sub> からゲノムDNAを抽出し、Double-Digested Restriction

## 論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

site-Associated DNA sequence (ddRAD-seq) 法などにより、計 321 個の一塩基多型 (SNPs) もしくは挿入/欠失 (Indel) マーカーを検出した。これらの表現型と遺伝子型の情報を組み合わせることにより、量的形質遺伝子座 (QTL) 解析を行った。その結果、第 12 番染色体において、0.1 %有意水準を満たす QTL のピークが検出された。この QTL の 95 %信頼区間内には 104 個の遺伝子が存在し、このうち 89 個の遺伝子がタンパク質コード遺伝子であった。当研究室の過去の研究により行われた Hi と Ha の全ゲノムシーケンスの結果を参照し、これらの遺伝子の中でアミノ酸置換が起きているものを調べた結果、75 遺伝子において系統間でのアミノ酸置換が確認された。さらに、アミノ酸置換がタンパク質の機能に及ぼす影響を予測したところ、17 遺伝子において有害とされるアミノ酸置換が検出された。アミノ酸置換はタンパク質の立体構造や物性を変化させることで酵素活性や液-液相分離の挙動などに影響し、生理機能を変化させる可能性がある。今後、これらの遺伝子におけるアミノ酸置換がメダカにおいて実際に臨界温度の決定に寄与するかどうかを明らかにする必要がある。

次に、臨界温度の決定において遺伝子の *cis* 制御領域の変異を介した発現量の差が関与する可能性を考慮し、系統間や飼育条件間における発現変動遺伝子を明らかにすることを目的として、トランスクリプトーム解析を実施した。10L/8 °C で飼育した Hi、Ha と、10L/8 °C から 14L/18 °C に移して 4 週間飼育した Hi、Ha の視床下部・下垂体を採集し、RNA-seq 解析を行った。GSI に差がみられた 14L/18 °C の Hi と Ha の間と 10L/8 °C と 14L/18 °C の Ha の間で発現が変動している遺伝子を調べ、両者の間でオーバーラップしている遺伝子を調べたところ、3111 遺伝子が検出された。さらに、これらの中で QTL 解析により明らかになった QTL の 95 %信頼区間内に存在するものを調べた結果、22 遺伝子が検出された。本研究では、この中から、バクテリアの温度適応への関与が報告されている Adenylate kinase 1 (*Ak1*) を臨界温度決定の有力な候補遺伝子と考えた。

*Ak1* がコードするタンパク質においては Hi と Ha でアミノ酸置換が起きていたため、まずこのアミノ酸置換が *Ak1* の熱安定性や温度依存的な酵素活性に及ぼす影響について、リコンビナントタンパク質を用いた *in vitro* の解析により評価した。その結果、系統間のアミノ酸置換による影響は小さいことが推察された。次に、*Ak1* が臨界温度決定の責任遺伝子であるかを調べるために、*Actb* プロモーター制御下で *Ak1* と *GFP* を過剰発現する *Ak1* 過剰発現 (*Ak1*-OE) メダカを作出した。*Ak1*-OE と同腹子の野生型 (WT) とを、10L/8 °C で繁殖活動を停止させた後に 14L/14, 16, 18, 20, 26 °C に移して飼育し、各条件における生殖腺を調べた。この結果、*Ak1*-OE、WT とともに 16 °C と 18 °C の間に生殖腺発達の臨界温度があることが分かった。以上の結果から、*Ak1* は臨界温度の決定には関与しないことが明らかになった。

## 論文審査の結果の要旨

別紙 1 - 2

Ak1 はアデニンヌクレオチド間の可逆的なリン酸化反応を通してエネルギー代謝の恒常性を保つ酵素であり、バクテリアからヒトまで高度に保存されている。これまで、細胞・組織レベルでの役割は報告されていたが、個体レベルにおける機能は明らかになっていない。Ak1-OE の臨界温度以外の表現型について調べるため、仔魚を用いた行動解析を行った。孵化直後の仔魚を 14L/25 °C で 3 日間トラッキングした結果、Ak1-OE は WT と比較して行動量が有意に上昇することが明らかになった。さらに、14L/15 °C で実験を行うと Ak1-OE の行動量の上昇はみられなくなることが分かった。また、超高速液体クロマトグラフィー (UHPLC) を用いて仔魚体内の ATP、ADP 量を調べた結果、Ak1-OE と WT の間で体内の ADP/ATP 比に差があることが示唆された。ADP/ATP 比の変化は下流で AMP-activated protein kinase (AMPK) と呼ばれる酵素を活性化させることが知られており、AMPK はショウジョウバエにおいて行動量の変化に関与する。以上より、Ak1 はエネルギー代謝の制御を介して行動量を変化させている可能性が考えられた。

本研究により、メダカにおいて臨界温度の決定に重要な候補領域と、その領域内に含まれる候補遺伝子が明らかになった。また、有力な候補遺伝子の一つと考えられた Ak1 は臨界温度に関与していないことが示された。本研究で得られた結果によって、臨界温度の決定機構が明らかになることが期待される。また、本研究ではこれまで明らかになっていなかった Ak1 の個体レベルにおける新たな機能を明らかにした。本研究によって、動物の環境適応機構への理解が深まるとともに、動物生産等、農学への貢献も期待されるため、当審査委員会は、本論文が博士(農学)の学位を授与するに値すると認め、合格と判定した。