

【主論文の要約】

メダカの季節適応におけるトランスクリプトーム解析

名古屋大学大学院生命農学研究科 動物統合生理学研究室

中山 友哉

季節が明瞭な地域でははっきりとした四季があるが、季節によって環境の状況は全く異なり、多くの動物にとって季節の環境変化は生命の危機を及ぼしうる重大な変化といえる。動物たちは、それらの環境変化に適応できるよう日々変動する季節の変化を読み取り、その季節に合わせた最適な生理機能や行動をとるよう進化してきた。季節によって変動する環境因子は日長、温度、降水量などがあるが、多くの動物は「日長」を季節の指標として利用している。この性質は光周性と呼ばれているが、動物の光周性による季節適応機構は未解明な点が多く残されている。当研究室では洗練された季節応答を示すウズラを用いることで春季感知による繁殖開始の脳内情報伝達経路を明らかにしてきたが、依然として遺伝子改変動物の作出がルーチンワークとして行えないという限界があった。一方、メダカは明瞭な季節応答を示すとともにゲノム情報の利用が可能であり、ゲノム編集技術が確立しているため、メダカをモデルとすることでさらに脊椎動物の季節適応機構を解明することが可能であると考えられた。そこで、本研究では季節適応研究において優れたモデルであるメダカを用いて、トランスクリプトームの観点から脊椎動物の季節適応機構に迫った。

短日条件から長日条件へと移行した際の視床下部および下垂体の時系列サンプリングを行い、DNA マイクロアレイによるゲノムワイドな発現解析を実施したところ、多数の転写産物やシグナル伝達経路が長日刺激によって変動していることが明らかとなった。その中には、ほかの転写産物より早く誘導されるとともに長日条件においてリズム的な発現変動をする *olvl28m13* と名がついた転写産物が含まれていた。NCBI データベースを確認したところ、*olvl28m13* は機能未知な長鎖ノンコーディング RNA (long non-coding RNA: lncRNA) として報告されていた。リボソームプロファイリング解析により脳で発現している *olvl28m13* がタンパク質へと翻訳される可能性を検討したところ、*olvl28m13* はリボソームと結合しておらず、RNA として機能する lncRNA であることが明らかとなった。この機能未知な lncRNA には正式な名前がついていなかったため、*long day induced antisense intronic RNA (LDAIR)* と名付けた。CRISPR/Cas9 システムを用いて *LDAIR* ノックアウト (KO) メダカを作製し、DNA マイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行ったところ、*LDAIR* は近傍遺伝子の発現を制御していることが明らかとなった。それらの近傍遺伝子の中にはストレス反応と関連があるコルチコトロピン放出ホルモン受容体 2 (corticotropin-releasing hormone receptor 2: CRHR2) が含まれていたため、*LDAIR* が *CRHR2* の発現制御を介してストレス反応を制御している可能性が示唆

された。*LDAIR* KO メダカを用いてストレス反応を評価することができる新奇水槽試験や明暗水槽試験などの行動解析を行ったところ、*LDAIR* の発現量が低い短日条件では野生型と *LDAIR* KO メダカの間に行動の差は見られなかったが、*LDAIR* の発現量が上昇する長日条件では野生型のメダカは *LDAIR* KO メダカと比べてストレスに敏感であり、危険な状況を避けることが明らかとなった。以上の結果より、*LDAIR* による *CRHR2* の日長制御は、繁殖期における自己防衛行動を制御していることが明らかとなった（第 I 章）。

メダカは春に繁殖を開始し、秋に繁殖を停止する長日繁殖動物であるが、動物がどのように秋を感知し、繁殖を停止しているかについては依然として明らかとなっていない。当研究室の先行研究によりメダカは日長が短くなることで秋季を感知し、繁殖停止していることが明らかとなっていた。そこで、長日条件から短日条件へと移行した際の視床下部および下垂体の時系列サンプリングを行った。それらの時系列サンプルを用いて DNA マイクロアレイによるゲノムワイドな発現解析を行ったところ、短日刺激に応答する遺伝子群として 1st wave genes、2nd wave genes、Cycling genes の 3 つに分類できることが明らかとなった。1st wave genes は短日条件移行 24 時間後に発現上昇し、それに続く 4 時間後に 2nd wave genes の発現が上昇していた。したがって、1st wave genes は 2nd wave genes の発現を制御していることが推測される。また、1st wave genes の中にはノンコーディング RNA (non-coding RNA: ncRNA) であり、スプライシングの際に重要な役割を果たすスプライソソームの構成因子である核内低分子 RNA (small nuclear RNA: snRNA) が多数含まれていた。さらに、興味深いことに 1st wave genes には全イントロンの 1% 以下しか存在しないマイナーイントロンを除くマイナースプライソソームを構成する snRNA が含まれていた。1st wave genes にスプライシング制御因子が多数含まれていたことから、メダカはスプライシングパターンを変化させ、秋季に適応している可能性が考えられた。RNA-seq によるゲノムワイドなスプライシングパターン解析を行ったところ、1st wave genes の発現上昇前後で多数の遺伝子のスプライシングパターンに変化が起きていることが示唆された。以上のことから、メダカは秋季を感知するとスプライシング制御因子の発現を上昇させることで下流遺伝子のスプライシングパターンを変化させ、繁殖期とは異なったタンパク質を作り出すことで、秋季に適応している可能性が考えられる（第 II 章）。

脊椎動物の季節適応機構の解明に取り組んでいる一連の実験の中で、メダカは光感受性や色覚が季節によって大きく変化していることが明らかとなってきたが、その分子基盤は不明のままであった。そこで、短日低温条件から長日温暖条件へと移行した際の眼の時系列サンプルを行い、ゲノムワイドな発現解析を行ったところ、オプシン遺伝子やその下流の情報伝達経路が季節によって大きく変化していることが明らかとなった。つまり、メダカは光情報伝達経路を季節によってダイナミックに変化させることで、光感受性や色覚を変化させていることが示唆された。しかし、オプシン遺伝子の季節変動を制御している因子は不明のままであった。トゲウオにおいてオプシン遺伝子の一つである *LWS* はテストステロンによって制御されているとの報告があったため、生殖腺除去

やホルモン投与を行うことで性ホルモンの影響を検討したが、いずれもオプシン遺伝子の発現に影響しなかった。最後に、日長や温度の影響を検討したところ、温度の上昇が引き金となってオプシン遺伝子の発現が誘導されたことから、メダカのオプシン遺伝子の発現は温度によって制御されていることが明らかとなった（第 III 章）。

本研究でのトランスクリプトーム解析により、第 I 章では lncRNA である *LDAIR* が、第 II 章では ncRNA である snRNA が季節適応に関与している可能性が示唆された。哺乳類ではゲノムの 95%以上を占める遺伝子外領域から ncRNA が転写されており、タンパク質をコードする遺伝子と同等数の lncRNA が存在することが知られているため、様々な季節適応現象に ncRNA が関与している可能性が考えられ、今後の研究によりそれらが明らかとなることを期待する。