

## 5. 繁殖システムの季節性を進化させる分子遺伝機構

東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻分子生態遺伝学分野  
准教授

石川麻乃

### 概要

生物の多くは特定の時期に繁殖し、また、種や集団ごとに独自の繁殖期を持つ。更に、動物の家畜化の多くは、繁殖の季節性が失われることで成立する。このような繁殖期の進化の分子遺伝機構を理解することは、温暖化などの環境変動に対する生物の応答予測や絶滅リスク評価、有用生物の育種に重要である。近年、研究代表者は進化生物学のモデル生物であるトゲウオ科イトヨを用い、繁殖期の進化の鍵遺伝子として甲状腺刺激ホルモン遺伝子 *TSHβ2* を同定した。そこで本研究では、*TSHβ2* が日長情報を受感する上流経路を解明することで、*TSHβ2* が繁殖期の進化を生む分子遺伝機構を理解することを目的とした。

*TSHβ2* が日長情報を受感する上流経路を解明するためには、繁殖の日長応答性に関わる *TSHβ2* を含めた遺伝子制御ネットワークを同定することが必要である。短日条件下で繁殖が抑制されることで短い繁殖期を示す「短繁殖型」の下垂体を用いたシングルセルマルチオーム解析の結果、*TSHβ2* 産生細胞と同定されたクラスターの中のサブクラスターで *TSHβ2* は短日条件で高く、長日条件で低く発現していた。更に、*TSHβ2* の上流配列のクロマチンアクセシビリティが短日条件で上昇していた。この領域について転写因子の結合モチーフ探索を行うと、RFX 転写因子の結合モチーフが濃縮されていた。RFX 転写因子は *TSHβ2* 産生細胞でも高く発現しており、*TSHβ2* の発現を直接的に制御する可能性がある。また、シングルセルマルチオームとは独立に行った *TSHβ2* のシス制御配列の集団間比較においても、集団間に変異が見られる領域に RFX 転写因子の結合モチーフ領域の濃縮が見られたため、これらの変異が繁殖期の進化を引き起こしている可能性もある。更に、*TSHβ2* を発現するサブクラスターで日長応答する遺伝子として、概日性遺伝子や光伝達関連遺伝子が検出された。これまでの下垂体培養実験から、*TSHβ2* の日長応答に関わる光感受は下垂体内で行われることが示唆されているため、これらの遺伝子が *TSHβ2* に日長情報を伝達する最上流経路に関わる可能性がある。また、短日条件下で繁殖が抑制されない長繁殖型の下垂体を用いて、同様にシングルセルマルチオーム解析を行なった結果、これらの光伝達関連遺伝子のうち、オプシン遺伝子の発現が長繁殖型で低下していた。これは、長繁殖型では、下垂体による光感受と *TSHβ2* 日長情報伝達経路のうち複数の制御機構が変化することにより、繁殖期の進化が生じていることを示唆している。

### 背景および目的

ツバメが夏に巣を作り、サケが秋に産卵するように、生物の多くは特定の季節に繁殖し、種や集団ごとに独自の繁殖期を持つ。更に、動物の家畜化の多くは、繁殖の季節性が失われることで成立する。では、どんな遺伝子や遺伝的変異により、繁殖期は進化するのか?このような繁殖期の進化の分子遺伝機構の理解は、温暖化などの環境変動に対する生物の応答予測や絶滅リスク評価、有用生物の効率的な育種に重要である。一方、繁殖期は多数の遺伝子により複雑に制御されることから、植物の開花時期など一部の例を除き、その多くは未解明だった。近年、代表研究者は進化生物学のモデル生物であるトゲウオ科イトヨを用い、繁殖期の進化の鍵遺伝子として、甲状腺刺激ホルモン遺伝子 *TSHβ2* を同定した。イトヨはもともと回遊性で、初夏の短期間に繁殖する「短繁殖型」である。一方、氷河期以降、淡水域に進出した集団では、早春から初冬まで長く繁殖する「長繁殖型」が何

度も進化した(Ishikawa & Kitano J Exp Biol 2020)。代表研究者は、網羅的発現解析とゲノム編集により、祖先的な短繁殖型では下垂体で発現する *TSH $\beta$*  が日長条件に応じて繁殖のオンオフを切り替える多機能性スイッチとして機能し、生殖腺や性ホルモン、脳トランスクリプトーム、性行動など様々な下流の形質を制御していることを明らかにした。一方、長繁殖型では、*TSH $\beta$*  遺伝子の日長応答性が失われることで、冬でも繁殖が可能となっていた。これは、動物で繁殖期の違いの原因遺伝子を実験的に示した初めての例である。*TSH $\beta$*  遺伝子の日長応答性の喪失は、イトヨの中で、異なる原因変異によって繰り返し起こっていることが分かってきた。更に、同様の現象が、近縁種のカニヨロだけでなく、遠縁のメダカでも生じていることが示された。これは、繁殖期の多様化において、*TSH $\beta$*  が進化のホットスポットとなり、繁殖期の違いを繰り返し生み出している可能性を示している。そこで本研究では、*TSH $\beta$*  が日長情報を受感する上流経路となる遺伝子制御ネットワークとその多様化機構を解明することで、*TSH $\beta$*  が繁殖期の進化を何度も引き起こした至近的機構を理解することを目的とした。

## 方法

*TSH $\beta$*  が日長情報を受感する上流経路を解明するためには、まず、繁殖の日長応答性に関わる *TSH $\beta$*  を含めた遺伝子制御ネットワークを同定することが必要である。これまでの研究から、*TSH $\beta$*  は下垂体に含まれる細胞のうち 0.1%程度の細胞で発現していることが分かってきた。更に、海型の日長応答前後でのシングルセル RNAseq 解析から、*TSH $\beta$*  を発現する *TSH $\beta$*  産生細胞は、性腺刺激ホルモン産生細胞、プロラクチン産生細胞、ソマトラクチン産生細胞、成長ホルモン産生細胞、甲状腺刺激ホルモン *TSH $\beta$*  産生細胞、副腎皮質刺激ホルモン/メラノサイト刺激ホルモン産生細胞などの主要なホルモン産生細胞とは異なるクラスターを形成することが分かった。そこで、各細胞群での遺伝子発現プロファイルとクロマチンアクセシビリティデータを得るために、海型の下垂体でシングルセルマルチオーム解析を行った。短日条件(8L16D)で飼育した短繁殖型イトヨの雄 3 匹と長日条件(16L8D)に変化後 1 日間の雄 3 匹をそれぞれ解剖し、下垂体細胞を 0.25%トリプシンで分離し、ライブラリ作成に用いた。ライブラリ作成には Chromium Next GEM Single Cell Multiome ATAC + Gene Expression (10x Genomics) を用いた。得られたライブラリーをシーケンス解析し、Cell Ranger と Seurat で解析した。更に、短日条件で飼育した長繁殖型イトヨの雄 4 個体と長日条件に変化後 1 日間の雄 2 匹の下垂体についても同様にライブラリーを作成し、シングルセルマルチオームによる解析を行った。*TSH $\beta$*  遺伝子の上流については、クロマチンアクセシビリティの上昇が見られる領域において jasper を用いた転写因子結合モチーフ探索を行った。

## 結果および考察

短繁殖型の下垂体を用いたシングルセルマルチオーム解析の結果、*TSH $\beta$*  産生細胞と同定されたクラスターは、性腺刺激ホルモン産生細胞、プロラクチン産生細胞、ソマトラクチン産生細胞、成長ホルモン産生細胞、甲状腺刺激ホルモン *TSH $\beta$*  産生細胞、副腎皮質刺激ホルモン/メラノサイト刺激ホルモン産生細胞などの主要なホルモン産生細胞とは異なるクラスターを形成した。更に *TSH $\beta$*  は *TSH $\beta$*  産生細胞内の一部のサブクラスター内で、短日条件で高く、長日条件で低く発現していた。これはこれまでの私たちの研究結果と一致する。更に、*TSH $\beta$*  の上流配列のクロマチンアクセシビリティが短日条件で上昇していた。この領域について転写因子の結合モチーフ探索を行うと、RFX 転写因子の結合モチーフが濃縮されていた。RFX 転写因子は *TSH $\beta$*  産生細胞でも高く発現しており、*TSH $\beta$*  の発現を直接的に制御する可能性がある。また、シングルセルマルチオームとは独立に行った *TSH $\beta$*  のシス制御配列の集団間比較においても、集団間に変異が見られる領域に RFX 転写因子の結合モチーフ領域の濃縮が見られたため、これらの変異が繁殖期の進化を引き起こしている可能性もある。更に、*TSH $\beta$*  を発現するサブクラスターで日長応答する遺伝子として、概日性遺伝子や光伝達関連遺伝子が検出された。これまでの下垂体培養実験から、*TSH $\beta$*  の日長応答に関わる光感受は下垂体内で行われることが示唆されているため、これらの遺伝子が *TSH $\beta$*  に日長情報を伝達する最上流経路に関わる可能性がある。また、短日条件下で繁殖が抑制されない長繁殖型の下垂体を用いて、同様にシングルセルマルチオーム解析を行なった結果、これらの光伝達関連遺伝子のうち、オプシン遺伝子の発現が長繁殖型で低下していた。これは、長繁殖型では、下垂体による光感受と *TSH $\beta$*  日長情報伝達経路のうち複数の制御機構が変化することにより、繁殖期の進化が生じて

いることを示唆している。現在、*TSH $\beta$ 2* の制御に関わる候補遺伝子やシス制御配列についてゲノム編集によるノックアウトイトヨを作成中であり、今後これらを解析することで、*TSH $\beta$ 2* が繁殖期の違いを繰り返し生み出す至近的機構をさらに詳細に明らかにする。

(完)