

ジャワメダカ的全ゲノム解析

— 海水適応や毒性試験におけるモデル魚種としての展望 —

竹花 佑介

長浜バイオ大学バイオサイエンス学部アニマルバイオサイエンス学科・ゲノム編集研究所

要旨

メダカ属 *javanicus* グループの代表種として、海水域に生息するジャワメダカ (*Oryzias javanicus*) の参照ゲノム配列を構築した。これにより、本種やその近縁種を用いた遺伝子解析やゲノム編集技術を用いた逆遺伝学的解析が極めて容易になった。本ゲノム情報を基に合成した本種の孵化酵素 HCE は海水中で高い活性を示し、海水での孵化に適した生理機能を有することが示唆された。また、多環芳香族炭化水素 (PAHs) の暴露によって薬物代謝酵素をコードする *Cyp1a* の発現が上昇することも明らかになり、本遺伝子が海水中の PAH 汚染を検出するマーカーとして有望であることが示された。

1. 海産魚におけるモデル生物としてのジャワメダカ

メダカ属 (*Oryzias*) はアジアに固有の小型魚類であり、これまでに 35 種以上が知られている。分布域は東アジアから南アジアまで幅広く、特に東南アジアの熱帯地域において形態的にも生態的にも著しく多様化している。しかも、彼らはいずれも飼育が容易で世代時間が短く、胚が透明なことや、トランスジェニック技術やゲノム編集技術が利用可能であることなど、メダカ (*O. latipes*) と同様のモデル生物としての利点を備えている。このように多様な表現型を示し、かつ分子遺伝学的アプローチを駆使できるメダカ属魚類は、生物進化の分子基盤を解明するのに最適な実験材料である¹⁾。著者らの研究グループはこれまでに、メダカ属には XY 型と ZW 型の性決定様式が混在し、性染色体も種ごとに異なるという、性決定機構にみられる著しい多様性を明らかにした²⁾⁵⁾。さらに、これら異なる性染色体をもつ近縁種からそれぞれ別の性決定遺伝子候補を特定し、それらの機能獲得実験や機能喪失実験によって新規の性決定遺伝子を同定してきた⁶⁾⁷⁾。また、種間雑種を用いた遺伝学的解析により、種間で異なる浸透圧耐性を支配する原因遺伝子領域が特定されるなど⁸⁾、近年メダカの近縁種を用いた進化研究が進展しつつある。

これらメダカ属魚類はほとんどすべてが淡水域に生息しているが、海水や汽水域に生息しているものが 2 種知られている。これまでの系統解析から、メダカ属は *javanicus* グループ、*latipes* グループ、*celebensis* グループの 3 つの単系統群に分けられ⁹⁾、海水に適応した 2 種は *javanicus* グループに含まれている。2 種の片方はタイからインドネシアにかけて主にマングローブ帯に生息するジャワメダカ (*O. javanicus*)

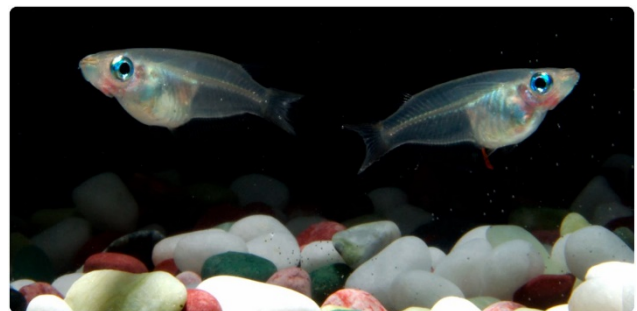


図 1. NBRP medaka から提供されているペナン産ジャワメダカ (文献 14 より転載)

(図1)、もう片方はインドからマレーシアにかけて海水と淡水の両方に生息するインドメダカ (*O. dancena*) である。両種とも海水への適応性は高いが、分布域が重なるマレーシア半島西岸では、ジャワメダカがより高浸透圧環境に、インドメダカがより低浸透圧環境に生息することから¹⁰⁾、ジャワメダカの方がより海水に適応していると考えられている。また、ジャワメダカは東南アジアのマングローブ生態系を支える代表的な構成メンバーであることから¹¹⁾、環境毒性学分野における海産試験魚としても利用されている¹²⁾⁻¹³⁾。そのため、本種は海水適応の分子機構を研究するためのモデル魚種としてだけでなく、海水中における化学物質の影響を評価する試験魚としても重要と考えられる。

2. ジャワメダカ参照ゲノム配列の構築

そこで著者らのグループは、ジャワメダカにおけるゲノム情報基盤を整備するため、本種の全ゲノム配列を決定した¹⁴⁾。NBRP medaka から分与されたペナン産ジャワメダカ

(*Oryzias javanicus*、系統 ID : RS831) のメス 1 個体からゲノム DNA を抽出し、PacBio RSII を用いてゲノム 76.5x 相当のロングリードデータ (61.8 Gb) と、10X Genomics Chromium のショートリードデータ (101.6 Gb) を取得した。まず、PacBio リードデータを使って

初期アセンブルを行い (SMARTdenovo)、これに 10X Genomics のデータを加えて polishing と scaffolding を行うことで、最終的な概要配列を構築した (コンティグ数 : 525 ; 総塩基数 : 809.7 Mb ; N50 : 6.31 Mb) (図2)。さらに、ジャワメダカの家系 RAD-seq データに基づく 6,375 個の SNP 情報を用いて連鎖解析を行い、321 個のコンティグ (総塩基の 97.7%) を 24 本の染色体上に位置づけることができた。これにより、scaffold N50 が 35.4 Mb に達する染色体レベルのゲノム配列を構築できた。BUSCO 解析による完全性は 94.4% であり、構築したゲノム配列の遺伝子の網羅性は高いと考えられた。このゲノムをメダカ参照ゲノムと比較したところ、ジャワメダカ染色体のほとんどがメダカの単一の染色体に対応した。さらに、各組織から RNA を抽出して RNA-seq 解析を行い、独自に遺伝子モデルも構築した。これらのゲノムデータはすでに Ensembl Genome Browser 等の公共データベースにて参照可能であり、本種やその近縁種を用いた遺伝子解析やゲノム解析、およびゲノム編集技術を用いた逆遺伝学的解析が極めて容易になったと言える。

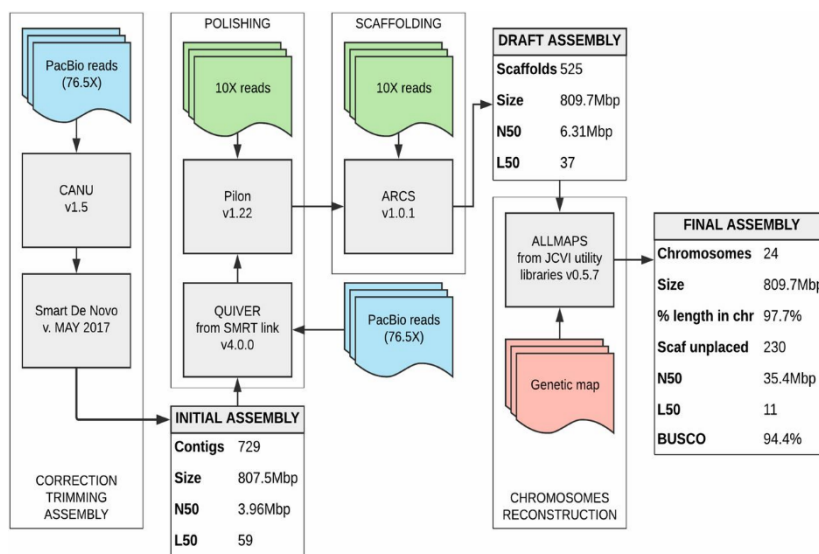


図2. ジャワメダカにおけるゲノムアセンブリのパイプライン (文献 14 より転載)

3. ジャワメダカの浸透圧調節遺伝子と孵化酵素遺伝子

硬骨魚類では、主要な浸透調節器官は鰓、腸、腎臓であり、体液の恒常性を維持するために異なる役割を果たしている。この浸透圧調節には、ホルモン、受容体、浸透液、輸送体、チャネル、細胞接合タンパク質をコードする多くの遺伝子が潜在的に関与している。そこで浸透圧調節に関連する遺伝子ファミリーの進化についての情報を得るために、ジャワメダカの遺伝子モデルから予測された全タンパク質情報について Pfam ドメインを同定した。本種とメダカ (*O. latipes*)、インドメダカ (*O. dancena*) の遺伝子モデルに基づくタンパク質配列を Pfam 探索に用い、浸透圧調節に関連する機能をもつ 224 個のタンパク質から見いだされた 147 個のドメインに着目した。その結果、各ドメインについて種間ではほぼ同数程度のタンパク質が検出され、ジャワメダカの浸透圧調節遺伝子群において特異的な数の増減は確認されなかった。このことから、メダカ属では浸透調節遺伝子のレパートリーが比較的よく保存されていることが示唆された。

本研究では、孵化酵素をコードする遺伝子群にも注目した。メダカ属魚類の胚は、胚発生の全過程において物理的ストレスから胚を保護するために、卵は卵膜によって包まれている。孵化段階で胚は卵膜を溶解するために特定の孵化酵素を分泌する。メダカでは、HCE (high choriolytic enzyme) と LCE (low choriolytic enzyme) の 2 種類の孵化酵素の協調的な作用により、卵膜の消化が行われる¹⁵⁾。メダカゲノムでは、3 番染色体上に *Hce* 遺伝子が 5 コピー (ひとつの偽遺伝子を含む)、同じ転写方向に縦列重複しているのに対し、24 番染色体上には *Lce* 遺伝子のコピーが 1 個しか存在しない¹⁶⁾。ジャワメダカゲノム中の *Hce* 遺伝子と *Lce* 遺伝子を検索したところ、それぞれがメダカの相同染色体から発見され、*Hce* (*OjHce*) 遺伝子は 5 コピー、*Lce* (*OjLce*) 遺伝子は 1 コピーであることが判明した (図 3A)。5 つの *OjHCE* の成熟酵素領域におけるアミノ酸配列の類似度は 89~99%であった。ただ、メダカと異なり、ジャワメダカでは 4 番目の *OjHce4* の転写方向が逆向きであったことから、メダカ属の進化過程において、*Hce* 遺伝子群で再配列が起こっていることが予想された。

LCE の活性は塩分濃度が変化しても一定であるが、HCE の活性は塩分依存性を示すことが報告されている¹⁷⁾。他のメダカ属魚類と異なり、ジャワメダカは海水環境に生息しているため、より高い塩分濃度に適応した生理機能を有することが予想される。このような適応進化が HCE 活性のレベルに反映されるかどうかを検証するために、大腸菌発現系で組換え *OjHCE3* (r*OjHCE3*) を生成し、リフォーリングした後、様々な塩濃度で卵膜の消化に関する活性を測定した。その結果、ジャワメダカの HCE (r*OjHCE3*) は 0 M NaCl ではほとんど活性を示さなかったが、塩濃度が高くなると活性が上昇す

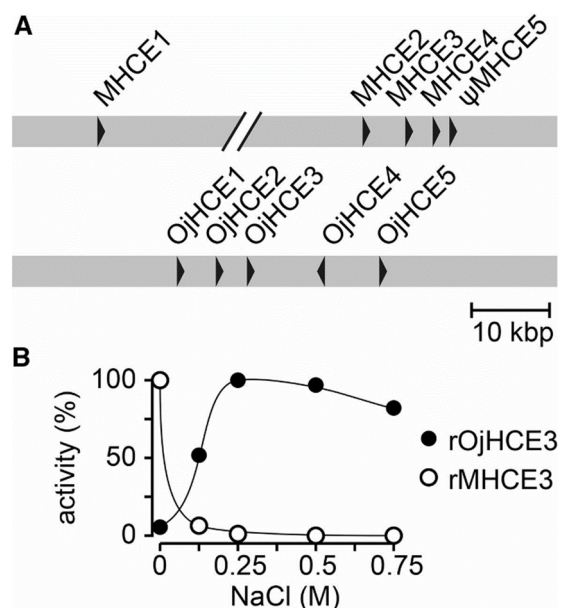


図 3. ジャワメダカの孵化酵素遺伝子とその活性 (文献 14 より転載)。

(A) メダカ (*mHce1-5*) とジャワメダカ (*OjHce1-5*) の *Hce* 遺伝子クラスター。矢印は転写方向を示す。(B) ジャワメダカ HCE (黒丸) とメダカ HCE (白丸) の塩分依存性。酵素活性は、各種での最高活性を 100% とする相対的活性を示す。

ることが明らかになった (図 3 B)。さらに、rOjHCE3 の活性は 0.25 M NaCl で最も高く、0.75 M NaCl まで高い活性を維持していた。一方、メダカの HCE は 0 M NaCl で最も高い活性を示し、塩濃度の上昇とともに急激に減少することが報告されている¹⁷⁾。これにより、両種はそれぞれ海水と淡水に生息していることから、それぞれの孵化環境に適した塩分嗜好性を持っていることが示唆された。

4. 海水中の毒性試験モデル魚としてのジャワメダカ

シトクロム P450 (CYP) 系は、様々な親油性基質の酸化代謝に関与するヘム含有タンパク質のスーパーファミリーである。CYP1A は、芳香族炭化水素、薬物、化学発がん物質を含む外因性基質の代謝の第一相に関与することが知られている。また、1970 年代半ばから公害指標としても提唱され、その分子基盤、遺伝子制御機構、有機外来物質に対する応答などが解明されてきた。CYP1A は脊椎動物に広く存在するが、魚類は常に水質汚染の脅威にさらされているため、魚類におけるその機能の解明は極めて重要である。実際に、汚染物質による *Cyp1a* 遺伝子の発現誘導は、さまざまな魚種において報告されている。

多価芳香族炭化水素 (PAH) は構造中に複数の芳香環を含む環境汚染物質の代表的なグループであり、その毒性作用は CYP1A を含む代謝酵素系に大きく関係している。ジャワメダカはメダカと同様に、化学物質の毒性試験をはじめとする毒性学分野のモデル魚として知られるが、生息域が海水であるため、海洋汚染に対する影響評価系として特に重要である。さらに本種は、マレーシア、インドネシア、タイ、シンガポール、インドの沿岸域に沿って広く分布しており、一年のすべての時期に利用可能であるため、野外における環境汚染の潜在的な生物指標となりうると考えられる。そこで著者らは、ジャワメダカへの PAH 暴露による *Cyp1a* 遺伝子の発現変化を検討した¹⁸⁾。

まず、ジャワメダカの主要臓器を対象とした *Cyp1a* の RT-PCR を行ったところ、肝臓で mRNA レベルが最も高いことが示された。また、ジャワメダカ成魚を代表的な PAH であるフェナントレンとピレンに暴露したところ、96 時間での LC50 はそれぞれ 3.9 μM および 2.5 μM であることが判明した。そこで LC50 よりも低濃度のフェナントレンとピレンを成魚に曝露し、肝臓における *Cyp1a* mRNA の発現量を定量 PCR によって調べた。その結果、*Cyp1a* mRNA レベルと両化合物の濃度との間に正の相関が検出され、PAHs 暴露によって本遺伝子の発現が誘導されることが確認された。このことから、*Cyp1a* 遺伝子は海水中の PAH 類による汚染を検出するためのマーカーとして有望であることが示唆された。今後、ゲノム編集技術によって本種の *Cyp1a* 遺伝子をノックアウトすることで、その生理機能を詳細に解析できると期待される。

参考文献

- 1) Hilgers L, Schwarzer J, The untapped potential of medaka and its wild relatives., *Elife*. 8, e46994 (2019).
- 2) Takehana, Y., Demiyah, D., Naruse, K., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M. (2007a) Evolution of different Y chromosomes in two medaka species, *Oryzias dancena* and *O. latipes*. *Genetics*. 175: 1335-1340.
- 3) Takehana, Y., Naruse, K., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M. (2007b) Evolution of ZZ/ZW and XX/XY sex-determination systems in the closely related medaka species, *Oryzias hubbsi* and *O. dancena*. *Chromosoma*. 116: 463-470..
- 4) Takehana, Y., Hamaguchi, S., Sakaizumi, M. (2008) Different origins of ZZ/ZW sex chromosomes in closely related medaka fishes, *Oryzias javanicus* and *O. hubbsi*. *Chromosome Res*. 16: 801-811.

- 5) Myosho T, Takehana Y, Hamaguchi S, Sakaizumi M (2015) Turnover of sex chromosomes in celebensis group medaka fishes. *G3: Genes, Genomes, Genetics* 5:2685-2691.
- 6) Myosho T, Otake H, Masuyama H, Matsuda M, Kuroki Y, Fujiyama A, Naruse K, Hamaguchi S, Sakaizumi M, Tracing the emergence of a novel sex-determining gene in medaka, *Oryzias luzonensis*., **Genetics** 191, 163-170 (2012).
- 7) Takehana Y, Matsuda M, Myosho T, Suster ML, Kawakami K, Shin-I T, Kohara Y, Kuroki Y, Toyoda A, Fujiyama A, Hamaguchi S, Sakaizumi M, Naruse K, Co-option of *Sox3* as the male-determining factor on the Y chromosome in the fish *Oryzias dancena*., **Nature Communications**. 5, 4157 (2014).
- 8) Myosho T, Takahashi H, Yoshida K, Sato T, Hamaguchi S, Sakamoto T, Sakaizumi M, Hyperosmotic tolerance of adult fish and early embryos are determined by discrete, single loci in the genus *Oryzias*., **Scientific Reports**. 8, 6897 (2018).
- 9) Takehana Y, Naruse K, Sakaizumi M, Molecular phylogeny of the medaka fishes genus *Oryzias* (Beloniformes: Adrianichthyidae) based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 36, 417-428 (2005).
- 1 0) Yusof, S., Ismail, A., Koito, T., Kinoshita, M., and Inoue, K., Occurrence of two closely related ricefishes, Javanese medaka (*Oryzias javanicus*) and Indian medaka (*O. dancena*) at sites with different salinity in Peninsular Malaysia. **Environmental biology of fishes** 93, 43-49 (2012).
- 1 1) Zulkifli SZ, Mohamat-Yusuff F, Ismail A, Miyazaki N., Food preference of the giant mudskipper *Periophthalmodon schlosseri* (Teleostei : Gobiidae). **Knowledge and Management of Aquatic Ecosystems** 405, 07 (2012).
- 1 2) Koyama J, Kawamata M, Imai S, Fukunaga M, Uno S, Kakuno A., Java medaka: a proposed new marine test fish for ecotoxicology. **Environmental Toxicology** 23, 487-491 (2008).
- 1 3) Horie Y, Kanazawa N, Yamagishi T, Yonekura K, Tatarazako N., Ecotoxicological Test Assay Using OECD TG 212 in Marine Java Medaka (*Oryzias javanicus*) and Freshwater Japanese Medaka (*Oryzias latipes*). **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology** 101, 344-348 (2018).
- 1 4) Takehana Y, Zahm M, Cabau C, Klopp C, Roques C, Bouchez O, Donnadieu C, Barrachina C, Journot L, Kawaguchi M, Yasumasu S, Ansai S, Naruse K, Inoue K, Shinzato C, Schartl M, Guiguen Y, Herpin A., Genome sequence of the euryhaline Javafish medaka, *Oryzias javanicus*: a small aquarium fish model for studies on adaptation to salinity., **G3: Genes, Genomes, Genetics**. 10, 907-915 (2020).
- 1 5) Yasumasu S, Kawaguchi M, Ouchi S, Sano K, Murata K, Sugiyama H, Akema T, Iuchi I, Mechanism of egg envelope digestion by hatching enzymes, HCE and LCE in medaka, *Oryzias latipes*. **Journal of Biochemistry**. 148: 439-448 (2010).
- 1 6) Kawaguchi M, Yasumasu S, Hiroi J, Naruse K, Suzuki T, Iuchi I, Analysis of the exon-intron structures of fish, amphibian, bird and mammalian hatching enzyme genes, with special reference to the intron loss evolution of hatching enzyme genes in Teleostei., **Gene**. 392, 77-88 (2007).
- 1 7) Kawaguchi M, Yasumasu S, Shimizu A, Kudo N, Sano K, Iuchi I, Nishida M, Adaptive evolution of fish hatching enzyme: one amino acid substitution results in differential salt dependency of the enzyme. **Journal of Experimental Biology**. 216, 1609-1615 (2013).
- 1 8) Rusni S, Sassa M, Takehana Y, Kinoshita M, Inoue K (2020) Correlation between cytochrome P450 1A (*cyp1A*) mRNA expression and ambient phenanthrene and pyrene concentration in Javanese medaka, *Oryzias javanicus*. **Fisheries Science**. 86, 605-613, (2020).