

脊椎動物モデルとしての小型魚類の発生と遺伝子システムの解明

●武田 洋幸¹⁾ ◆成瀬 清¹⁾ ◆工藤 明²⁾ ◆堀 寛³⁾

1) 東京大学大学院理学系研究科生物科学専攻 2) 東京工業大学大学院生命理工学研究科
3) 名古屋大学大学院理学研究科

＜研究の目的と進め方＞

脊椎動物の基本的体制を備えた最も古い動物群である魚類は脊椎動物の進化を考える上で重要な存在である。さらに、近年小型魚類はその利点（多産、透明、母体外の早い発生、短い世代交代時間など）を生かして遺伝学、発生学研究の脊椎動物モデルとして多く用いられている。そして、脊椎動物の発生・成長に重要な遺伝子の機能は種を越えて保存されていることがわかってきた。しかし、脊椎動物の進化はこれら重要遺伝子群の機能とその発現の微妙な変化の蓄積によって起こったと考えられる。従って、進化的に重要な動物群の遺伝子システムを詳細に解析することは、脊椎動物の進化や発生の共通原理を理解するためには不可欠である。本研究の目的は、小型魚類メダカを用いてその発生過程に働く遺伝子システムを発現遺伝子とゲノム構造の両面から解析することを第一の目的としている。

現在、ゲノム研究の対象となり得る魚類は、フグ、ゼブラフィッシュ、メダカの3種類である。その中で我々は以下の様な理由で、メダカを実験材料に選んだ。フグは、ゲノムサイズは400Mb（ヒトは3,000Mb）と小さいが、実験発生学、遺伝学を使った遺伝子機能解析ができない致命的な欠点がある。一方、この分野で先行しているゼブラフィッシュはゲノムサイズが1,700Mbと大きく複雑で、ゲノム解析には必ずしも適さないことが判明した。これに対して、メダカはゲノムサイズが700-800 Mbで比較的小さく、実験発生学、遺伝学でゼブラフィッシュと同等のポテンシャルを持つ。また、ゼブラフィッシュにはない多数の純系が国内で樹立されている。特に、北日本と南日本系統の間では、non-codingで3%, coding領域で1%の塩基配列の差（SNP, ゼブラフィッシュの持つ多型の約5倍）が存在し、これが変異体の原因遺伝子同定に極めて有利な条件となる。実際、メダカを使った発生研究が海外でも広がり始めている。

これまでに国内では、ESTの単離や連鎖地図作製などのメダカゲノム解析の基盤が整備されつつある。しかしながら、この先行研究には発生の遺伝子システムの解明は含まれていなかった。さらに現在、メダカ研究は大きな転機を迎えている。我々を含む国内外の研究グループにより、初期発生・器官形成に異常を示すメダカ突然変異体が多数単離され、この中には、ゼブラフィッシュにはない新規変異体も多数含まれている。つまり、「新規変異体の単離→表現型の解析→連鎖地図へのマップ→原因遺伝子の同定→脊椎動物共通の発生・器官形成の解明」という流れが生まれつつある。脊椎動物間の共通性から、これらの研究成果はヒトへ直接応用可能であり、医学、創薬の分野への波及効果も期待される。この流れを加速するためには、メダカ全ゲノム配列の決定が最も効果的であり、メダカゲノムプロジェクトが開始された。本研究では、メダカゲノムプロジェクトと共同し、(1)メダカ胚、稚魚のEST、SNPの大規模な収集と連鎖地図へのマッピングおよび特定の領域や染色体に絞ったゲノム構造解析（武田・成瀬）（図1）、(2)形態形成遺伝子群Hox

クラスターの構造と進化の解析（堀）、(3)メダカの器官（尾ヒレ再生、循環器、骨など）形成に注目したEST解析と突然変異体の解析（工藤）を実施する。

＜研究開始時の研究計画＞

武田研究室

初期発生過程で発現するESTの網羅的単離を中心にメダカゲノム情報の基盤を構築する（図1）。また、2002年から始まったメダカゲノムプロジェクトをコア研究室として推進する。

- ①メダカ初期胚で発現する遺伝子の網羅的単離と連鎖地図へのマッピング：器官形成が最もダイナミックに進行するステージ（原腸胚期から体節期）の胚（純系Hd-rR系統）、稚魚、成体より良質のcDNAライブラリー（directional）を作製して、ランダムに両端シーケンズを行う。これにより初期胚から成体までの組織で発現する大規模なEST単離を実施する。また、重要な遺伝子を優先して、順次連鎖地図へのマッピングを行う。
- ②メダカ初期胚で発現する遺伝子の発現パターンの解析：シーケンズが判明した独立ESTクローンに関して、初期胚での発現パターンを解析する。
- ③遺伝子マーカーマッピングのための新しい交配パネルの作成とそれを用いた高密度連鎖地図の作成：計画時では、連鎖地図へのマッピングは東大・嶋研究室が作製した北日本純系HNIと南日本純系AA2とのバッククロス39個体由来のDNAパネルを用いていた。このパネルの精度は約2.5 cM（1 cM = 600kb）である。Positional cloningやBACの整列にはさらに精度の高いマッピングが要求される。このため、HNIとHd-rR（南日本由来の純系、変異体スクリーニングに主に使用されている）のバッククロスパネルを新たに作る。雄、雌由来のF2、それぞれ100個体よりgenome DNAを抽出して、これをパネルとする（精度は1cM）。既存の連鎖地図を用いて評価を行った後、マッピングに使用する。

メダカ初期胚からの発現遺伝子の網羅的単離、発現パターン解析、マッピング

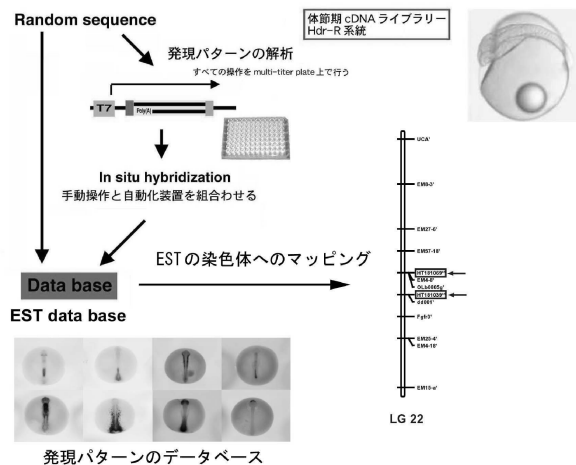


図1. medaka EST 単離を中心とした解析の流れ

堀研究室

形態形成遺伝子群として知られるHox遺伝子は、硬骨魚類の条鰭類では、我々の解析しているメダカをはじめ、代表的な種において当初の予想と異なり基本的に7クラスターである事が判明してきた。これらを比較ゲノムの観点からDNA配列比較することでその進化を明らかにする。

- ①メダカの形態形成遺伝子群 Hox クラスターのゲノム解析による形態進化機構の解析：メダカ全hoxクラスターの配列を決定する。哺乳類の4セットの構造と比較することにより、魚類の7セットの役割とゲノム構成の進化を明らかにする。
- ②BACクローン（南日本系統Hd-rR）のコンティグの整備：連鎖地図上に置かれてある遺伝子マーカー約200個を用いて、200座位とウオーキングによるその周辺領域でのBACクローンの物理地図を整備を開始する。遺伝子マーカーとして、上述の1のESTのマッピング情報に加えて、特定領域研究（B）「メダカに学ぶ脊椎動物ゲノム再編の分子基盤（代表者：嶋昭絃）」で得られているHNI系統のBACクローンの末端配列決定とそのメダカ連鎖地図上へのマッピング、およびESTの情報も有効に利用する。マーカー部位から1から3個のBACクローンでそれぞれ歩いて、合計400から600個のBACクローンを連鎖地図に配置する。

工藤研究室（H8,9は公募研究、H10-12は計画研究分担）

メダカのヒレは切断後、約2週間で元に戻り、再生研究の材料として特に優れているにも関わらず、これまでメダカのみならず魚のヒレを使った再生研究はほとんどなされていらない。ヒレの再生には骨、血管、神経等の各組織の形成も惹起され、その再生過程は発生過程の繰り返しである。ヒレ切断後発現している遺伝子群は再生時期で非常に異なり、その発現遺伝子がヒレ再生の各段階における組織特異性を示していると考えられる。従って各ヒレ再生段階に発現している遺伝子群の網羅的スクリーニングを行うことにより、どのように組織形成されるかその全体像を捕まえることが可能になると共に、組織形成特異的遺伝子のクローニングが可能になる。網羅的スクリーニングで得られたcDNA塩基配列は今後メダカESTの基盤となる。

一方小型魚類の特徴である突然変異体の大規模スクリーニングを行い、これまでゼブラフィッシュでは得られなかった表現型の器官形成・再生突然変異体を確立するとともに、原因遺伝子のクローニング・機能解析を行う。

- ①ヒレ再生過程で発現する遺伝子群のEST解析：メダカ尾ヒレを切断後、3日目、10日目の再生部位からRNAを抽出し、EST解析を行う。得られたESTクローンからヒレ再生特異的な遺伝子を得て、その機能解析を行う。
- ②メダカ器官形成変異体の単離：ENU変異法を用いて、できるだけ多くのメダカ器官形成変異体を単離する。

＜研究期間の成果＞

武田研究室

- ①メダカ各発生段階のcDNAライブラリーを作成して、ESTの大規模な収集（配列決定）を行って、DDBJに登録・公開した。H17年3月現在、公的データベース上のメダカのESTの数は197,290であり、そのうち本研究により登録されたものは184,559件となった（図2）。得られたESTのreverse配列をもとに8,091クラスターを選択して、オリゴDNAマイクロアレイを作成し（medaka

microarray 8K）、その評価も行った（文献26, 29）（図3）。また、EST400個をメダカ連鎖地図へマップした。マップしたESTマーカーの中から、南と北の系統間でPCR length polymorphismを示すものを厳選して、変異体マッピングシステムM-marker 2003を構築した。このシステムでは、現在使用されているほとんどの系統で利用できる（文献26, 29）。

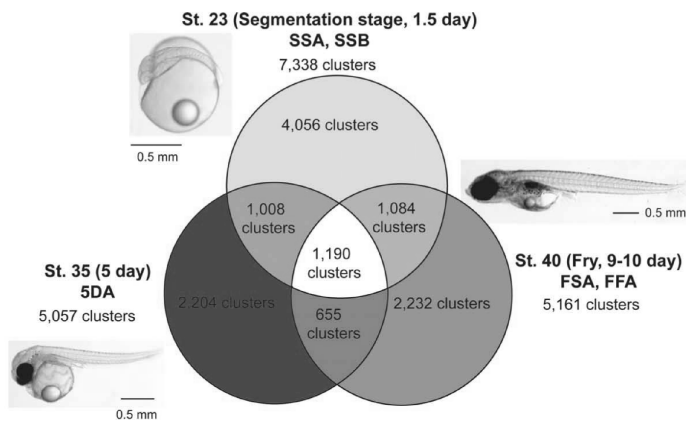


図2. 3つの胚期から単離されたESTの共通性（文献26）
1.5日胚(st.23)、5日胚(st.35)、稚魚（9日、st.40）の比較

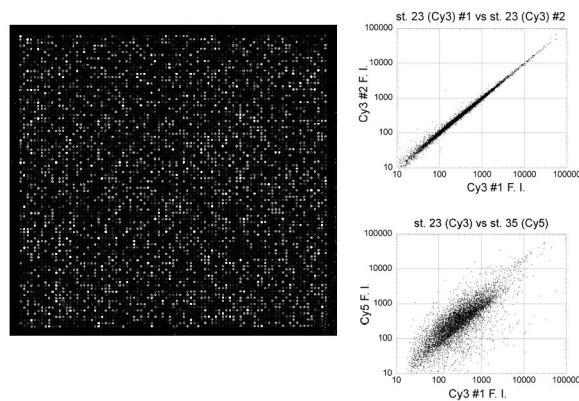


図3. メダカ遺伝子8,000個を載せたマイクロアレイ（左）と2つの胚ステージ（1. 5日胚st.23 vs 5日胚st.35）の発現比較（文献26）

- ②1,000クローンに関して、初期胚での発現パターンを記録して公開した（文献26, 56）。
- ③Hd-rR（南日本純系）とHNI（北日本純系）バッククロス94個体のgenome DNAによるパネルを完成させた。これを用いて、SNPsを連鎖地図へマップすることを試みた。MassArray systemにより、迅速にしかも非常に正確にSNPsのマッピングできることが判明した。このパネルと、南北集団間での塩基置換SNPマーカーを用いて、突然変異体の原因遺伝子同定の効率化とゲノムプロジェクトで生成されたscaffoldを染色体上へ貼り付けるための高密度SNP連鎖地図を作成した。約2,500のSNPマーカーの載った高密度連鎖地図が完成した（図4）。現在投稿準備中である。

LG 3

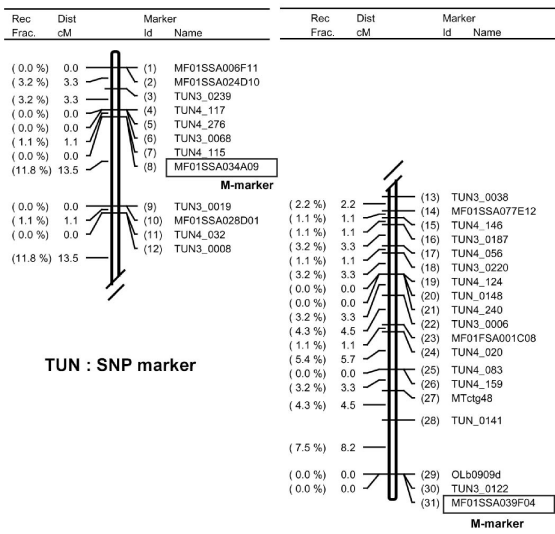


図4.メダカ連鎖群3 (LG 3) に載っているSNPマーカー

- ④硬骨魚類の普遍的発生機構を探るため、メダカと進化的に離れているゼブラフィッシュでも発生機構の研究を行った。ゼブラフィッシュの内胚葉形成に関連する遺伝子の単離 (文献5)、神経誘導とパターン形成 (文献4, 6, 11) および体節形成 (文献7, 8, 13) に関する遺伝子ネットワークの解析を行って、その成果を論文として発表した。
- ⑤メダカWGS法によるメダカゲノムプロジェクトを小原研究室、森下研究室とともに推進している。各種ライブラリーの作成を行い、シーケンスセンターへ提供した。ゲノムシーケンスは2005年中に完成した。現在投稿準備中である。

堀研究室

- ①メダカ近交系統Hd-rR のBAC ライブラリーの構築：1999年度までの研究 (Kurosawa et al., 1999) によって、メダカHox遺伝子は硬骨魚類では哺乳類が4クラスターからなるのと異なり、7クラスターから構成されると予測された。それを解析するために、92,000 クローンよりなるメダカ純系系統Hd-rR のBAC ライブラリーを構築した (文献9)。
- ②メダカの性決定遺伝子DMY を分離同定：このBAC ライブラリーを用いて、メダカの性決定遺伝子をY染色体よりポジショナル・クローニングしたところ、この遺伝子はセンチウヤやショウジョウバエの性決定遺伝子である mab-3 や dsx と共通のDMドメインを持っていた (文献18)。
- ③メダカアルビノ変異体の遺伝解析：メダカのアルビノ変異体の変異の原因について、そのゲノム構造から詳細に観察した、また原因となった転位因子のゲノム内転位について、このBAC ライブラリーを用いて、転位場所や、転位したトランスポゾンの解析をした (文献1, 2, 17, 36, 48, 54)。
- ④メダカZP domain タンパク質の遺伝子クラスターの同定：メダカのメスの性分化を明らかにするため、マ

ーカーとして卵の構成成分である ZP domain タンパク質に注目した。そのためBAC ライブラリーを用いて、ZP遺伝子クラスターを分離し、その構造を決定した (文献24)。

- ⑤メダカ研究者へのBAC ライブラリーの供給とBAC クローンを用いた遺伝子の分離、構造決定、遺伝子導入：メダカのグアニリルシクラーゼ遺伝子群の分離同定 (文献20, 22, 49)。メダカの塩水、淡水適応を司る Natriuretic Peptidesの同定とその遺伝子の分離、構造決定 (文献39)。
- ⑥メダカ全ゲノム決定のためのBAC コンテイングマッピング：メダカゲノムプロジェクトによりメダカドラフトゲノムが完成した。このドラフトゲノムをさらに完成度の高いゲノム配列とするためには BAC クローンのコンテイングマップ作成が重要である。そのためのBAC の整列化を行った (文献38, 39, 40)。
- ⑦メダカのhox クラスターの構造決定と比較ゲノム：メダカ全hox 遺伝子を含むBAC clone (7クラスター分 10種類) を単離同定し、それらすべてをshotgun sequencing により配列を決定した。その全長は約1400 Kbの全体像をえることができた。その結果、メダカHoxクラスターはゼブラフィッシュ同様7クラスターであるが、メダカにはhoxCbが存在せず、ゼブラにはhoxDbが存在しない、という大きな相違がみられた。これは一度8倍化したクラスターが再編成過程で、メダカとゼブラでは異なるクラスターが消滅したことを意味している。さらにフグゲノムWGSの膨大な情報をメダカのゲノム配列と比較し、比較ゲノム的にメダカゲノムを明らかに以下の論文にまとめ、投稿し印刷中である (図5) (Kurosawa et al., 文献53)。

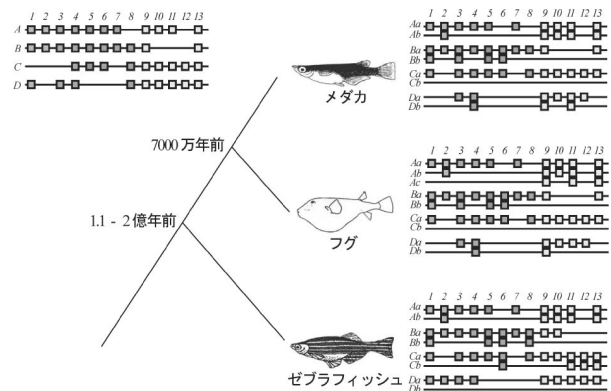


図5 条鰭魚類のHoxクラスターの比較

マウスやヒトのA, B, C, Dの4クラスターに対し、魚類では各クラスターが倍化しa, bのサブクラスターを生じ、例えばAクラスターはAa, Ab, 等になっている。その後ゼブラフィッシュはDbを、メダカ・フグはCbクラスターを失わない、各々、7クラスター構造となった。

工藤研究室

- ①再生芽が形成され、幹細胞が分化開始する時期であるメダカヒレ再生3日目のcDNAライブラリーを構築し、遺伝子において10000シーケンスが終了した。その結果8901個のシーケンスが得られ、そのうち3454種類の遺伝子が含まれ、1個しかシーケンスがなかったもの

が2323個あり全体の67.2%を占めた。3454のうち1166クラスター(33.8%)のみが、10日目のシークエンスと重なっており、再生芽特異的cDNAがかなり含まれていると思われる。マイクロアレイによるメダカヒレ再生初期に特異的に発現する遺伝子のスクリーニングにより、3000個のESTから6個の遺伝子が単離された。特に再生1日目に特異的発現を示す2個の遺伝子をメダカ発生過程における発現解析を行った結果、その中の1個はメダカで常に再生を繰り返している器官である咽頭歯に特異的に発現していた(文献33)。

②武田研究室と共同での突然変異体スクリーニングの結果、現在までに収集した突然変異体として、心臓・血管系の異常を示すものが59系統、血球異常9系統(文献32)、骨のパターン形成異常19系統、鱗の異常25系統、尾鱗の再生異常16系統などがあり、特にゼブラフィッシュでは全く単離されていない椎骨形成不全や、発生は正常でヒレ再生のみ異常な変異体の単離に成功したことは特筆される(図6を参照)。突然変異体の中には、ヒトの先天的疾患と対応する表現型のものが多数含まれ、さらに原因遺伝子がヒト遺伝病と同じものとして、ヘモグロビン合成の酵素であるALAD遺伝子の同定とそのメダカ変異体whoの確立に成功しており、ヒトのポリフィリン血症の原因遺伝子と同じことから、メダカ突然変異体が疾患モデルとしても有用であることが実証された(文献31)。また、血管システムや骨のパターン形成の解析のため、これらの器官特異的にGFPを発現するトランスジェニックメダカを作成することに成功している(文献30)。

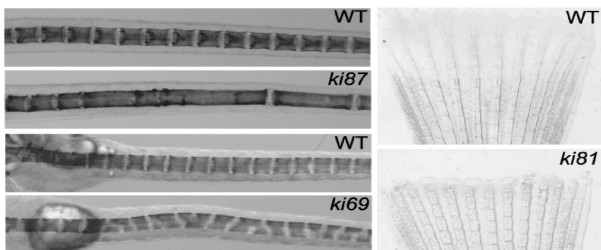


図6 脊椎骨が融合する突然変異体ki87、脊椎骨がジグザグ状に形成突然変異体ki69、および鱗の再生に欠損を示す突然変異体ki81

以上のように、我々は器官形成突然変異体を現在166種類を得ており、特に重要な20種類については原因遺伝子の同定を行い、現在4種類の変異体の原因遺伝子が同定されつつある。変異体の総合的な解析にはメダカ各器官の組織学的解析、発生生物学的検討が必要だが、我々は各メダカ器官固有の遺伝子の収集に努め、その発現解析を行うとともに発生過程における組織学解析を進めた(文献3, 15, 30, 34, 35, 46)。

〈国内外での成果の位置づけ〉

武田研究室

突然変異体の単離が進行しているメダカでは、早急にゲノム、発現遺伝子の基盤整備が求められている。本研究のESTデータは、変異体表現型の解析に不可欠な組織特異的なものも多く含まれていた。現在登録されているメダカESTsの90%近くが本研究によるものであり、他

の追従を許さない。また、単離されたESTの連鎖地図へのマッピングについては、これまでにマップされたマーカーの3割程度を占めるに至っている(全体で1100 ESTsがマップ済み)。これらの情報は、すべて公開され、メダカ研究者を中心に利用されている。

さらに、一回のPCR(96個)で突然変異体を連鎖群に落とすことができるマーカーセット(M marker)を整備し、国内外の複数の研究室に配布している。以上のように、EST収集を出発点にしてメダカ研究の基盤整備を進めており、国内外のメダカ研究室へ情報と材料を積極的に供給している。

メダカゲノムプロジェクトは、2002年9月より、国立遺伝学研究所・小原研究室、東京大学・森下研究室、東京大学・武田研究室がコアとなって始まった。このプロジェクトは、Whole genome shotgun法により800Mbにおよぶ脊椎動物ゲノムを比較的少数の国内研究者で解読するという野心的なプロジェクトであった。プロジェクトは成功裏に進み、2005年中に解読は完了した。この過程で、これまで産生していたEST, SNP, 高密度地図などの情報が効果的に使用された。メダカゲノムのデータはすでに森下研究室のウェブサイトより公開され(<http://medaka.utgenome.org/>)、世界中の研究者に利用されている。日本主導のゲノムプロジェクトとして、大きな反響を呼んでいる。

堀研究室

メダカの性決定遺伝子DMYを分離同定(文献18)。メダカの性染色体は古くからXY型であることが知られていたが、この論文はそのY染色体上の性決定遺伝子がDMY遺伝子であることを明らかにしたものである。このDMYはショウジョウバエやセンチウ、カイコなどでも性決定に関与しているDMドメインを持ち、動物界に存在する普遍的な性決定機構を示唆するものであった。それまでヒトを含めた哺乳類の場合はY染色体上の性決定遺伝子としてSRY遺伝子が同定されていた。しかしさらに詳しい研究の結果、SRYの下流にはDMRT1と呼ばれるDMYのホモログが発現し、これが性分化に重要な働きをすることが判明した。これによって動物の性決定機構はXY型、ZW型、温度依存型、棲息環境型等に多様化しているけれども、それはDMの発現を支配する上流の多様化であって、性決定そのものは最終的にはDM関連遺伝子が働くことで性分化がおり、この遺伝子が重要であることが提唱されるにいたっている。

工藤研究室

このようなESTによるヒレ再生特異的遺伝子の単離と解析はゼブラフィッシュの論文もなく、メダカが最初のデータのため、そのクローンの特徴が目目された。特に、心臓再生との共通性に関心が集まった。メダカ器官形成突然変異体については、この結果が世界で初めてのメダカ器官突然変異体スクリーニングの結果であるため、その表現型が目目された。ゼブラフィッシュでは得られない変異体が多く存在することにより、メダカが実験動物として優れていることが認識された。

〈達成できなかったこと、予想外の困難、その理由〉

武田研究室

ESTの単離より得られた遺伝子の発現情報が1,000個にとどまっている。当初5,000個の発現解析を目指していた。これは研究期間中に、メダカゲノムプロジェクトが立ち上がり、研究室の資源を優先的にこのプロジェクトに振

り分けたためである。

堀研究室

hox クラスターのゲノム構造解析については完全に精度の高い配列結果をうることができたが、その遺伝子の発現を調べて正確に記述するまでにはいたらなかった。クラスター内の兄弟遺伝子（例：A9a と A9b を区別できるプローブ等）の相似度が高いため、適当なプローブ設計に手間どった。

工藤研究室

メダカ再生特異的遺伝子の解析のため、再生ビレへの遺伝子、アンチセンスオリゴヌクレオチドの導入を種々の方法で試みたが、再現性のあるデータが得られていない。その結果、遺伝子の機能解析が遅れている。スクリーニングで突然変異体を得たのち、その変異体をメンデル遺伝するクローンとして確立するのに、変異体スクリーニングと同じ程度の期間を要し、一部の変異体の解析が不十分のままである。

<今後の課題>

武田研究室

本研究室で産生されたゲノム情報（EST、発現、SNP、連鎖地図、マイクロアレイ等）、ゲノムプロジェクトで産生された膨大なゲノム情報、国内外で産生中のEST、発現情報、cDNA（特にfull length cDNA）を一元的に取り込んだメダカゲノムウェブサイトの構築の必要性を痛感している。

堀研究室

hox Aa, Abなど二倍化したhox クラスターで、その発現解析を行い、各々の発現場所の相違をみている。この研究が終了しなかった。

工藤研究室

再生特異的遺伝子の機能を明らかにすることにより、再生医療の応用に役立てる。突然変異体のポジショナルクローニングを更に加速し、それぞれの原因遺伝子を明らかにする。その結果得られた遺伝子群からそれぞれの器官形成の分子機構を明らかにすることにより、器官形成の基盤を確立し、ヒト疾病の治療、器官形成・再生の応用に役立てる。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

1.0602092243

Koga A, Hori H. Detection of de novo insertion of the medaka fish transposable element Tol2. *Genetics* 156(3) : 1243-1247 (2000)

2.0602092249

Koga A, Shimada A, Shima A, Sakaizumi M, Tachida H, Hori H. Evidence for Recent Invasion of the Medaka Fish Genome by the Tol2 Transposable Element. *Genetics* 155(1): 273-281, (2000)

3.602021122

Inohaya, K. and Kudo, A: Temporal and spatial patterns of cbfal expression during embryonic development in the teleost, *Oryzias latipes*. *Development, Genes and Evolution*, 210:570-574

(2000).

4.0202251512

Sakaguchi, T., Kuroiwa, A. and Takeda, H. Expression of zebrafish *btg-b*, an anti-proliferative cofactor, during early embryogenesis. *Mechanisms of Develo* 104: 113-115 (2001).

5.0202251525

Sakaguchi, T., Kuroiwa, A. and Takeda, H. A novel sox gene, 226D7, acts downstream of Nodal signaling to specify endoderm precursors in zebrafish. *Mechanisms of Development* 107: 25-38 (2001).

6.0202251534

Shinya, M., Koshida, S., Sawada, A., Kuroiwa, A. and Takeda, H. Fgf signalling through MAPK cascade is required for development of the subpallial telencephalon in zebrafish embryos. *Development* 128: 4153-4154 (2001).

7.0202251540

Sawada, A., Shinya, M., Jiang, Y.-J., Kawakami, A., Kuroiwa, A., and Takeda, H. Fgf/MAPK signalling is a crucial positional cue in somite boundary formation. *Development* 128: 4873-4880 (2001).

8.02002251545

Saga, Y. and Takeda, H. The making of the somite: molecular events in vertebrate segmentation. *Nature Reviews Genetics* 2 (November), 835-845 (2001).

9.0602092235

Matsuda M, Kawato N, Asakawa S, Shimizu N, Nagahama Y, Hamaguchi S, Sakaizumi M, Hori H. (2001).

Construction of a BAC library derived from the inbred Hd-rR strain of the teleost fish, *Oryzias latipes*. *Genes Genet Syst.* 76(1): 61-63.

10.0602092240

Koga A, Hori H. The Tol2 transposable element of the medaka fish: an active DNA-based element naturally occurring in a vertebrate genome. (Review) *Genes Genet Syst.* 76(1): 1-8 (2001).

11.0210091339

Koshida, S., Shinya, M., Nikaido, M. Ueno, N., Shulte-Merker, S., Kuroiwa, A. and Takeda, H. Inhibition of BMP activity by the FGF signal promotes posterior neural development in zebrafish. *Developmental Biology* 244: 9-20 (2002).

12.0210091344

Nomura-Kitabayashi, A., Takahashi, Y., Kiatjima, S., Inoue, T., Takeda, H. and Saga, Y. Hypomorphic *Mesp* allele distinguishes establishment of rostrocaudal polarity and segment border formation in somitogenesis. *Development* 129:2473-2481 (2002).

13.0210091349

Nikaido, M., Kawakami, A., Sawada, A., Furutani-Seiki, M., Takeda, H*. and Araki, K*. *Tbx24*, a novel T-box gene, is

- mutated in the zebrafish somite segmentation mutant fused somites. (*, HT and AK are corresponding authors). *Nature Genetics* 31: 195-199 (2002).
- 14.0210091357
Yokoi, H., Kobayashi, T., Tanaka, M., Nagahama, Y., Wakamatsu, Y., Takeda, H., Araki, K., Morohashi, K. and Ozato, K. *sox9* in a teleost fish, medaka (*Orizias latipes*): evidence for diversified function of Sox9 in gonad differentiation. *Molecular Reproduction and Development* 63: 5-16 (2002).
- 15.602021130
Nagaya, M., Inohaya, K., Imai, Y. and Kudo, A.:Expression of *zisp*, a DHHC zinc finger gene, in somites and lens during zebrafish embryogenesis. *Mechanisms of Development* 119S, S311-S314 (2002).
- 16.0303281401
Koga A, Hori H, Ishikawa Y. *Gamera*, a family of LINE-like repetitive sequences widely distributed in medaka and related fishes. *Heredity* 89(6): 446-452 (2002).
- 17.0303281357
Koga A, Hori H, Sakaizumi M. Gene transfer and cling of flanking chromosomal regions using medaka fish Tol2 transposable element. *Mar. Biotech.* 4: 6-11 (2002).
- 18.0210151545
Matsuda M, Nagahama Y, Shinomiya A, Sato T, Matsuda C, Kobayashi T, Morrey CE, Shibata N, Asakawa S, Shimizu N, Hori H, Hamaguchi S, Sakaizumi M. *DMY* is a Y-specific DM-domain gene required for male development in the medaka fish. *Nature* 417(6888): 559-563 (2002).
- 19.0303281345
Koga A, Sakaizumi M, Hori H. Transposable elements in medaka fish. *Zoolog Sci.* 9(1): 1-6 (2002).
- 20.0404081344
Yao Y, Yamamoto T, Tsutsumi M, Matsuda M, Hori H, Naruse K, Mitani H, Shima A, Asakawa S, Shimizu N, Suzuki N. Genomic Structure and Expression of the Soluble Guanylyl Cyclase alpha(2) Subunit Gene in the Medaka Fish *Oryzias latipes*. *Zoolog Sci.* 20(10): 1293-304 (2003).
- 21.0404081334
Tsutsumi M, Koga A, Hori H. Long and short mRNAs transcribed from the medaka fish transposon Tol2 respectively exert positive and negative effects on excision. *Genet. Res.* 82: 33-40 (2003).
- 22.0404081305
Yamagami S, Xu SH, Tsutsumi M, Hori H, Suzuki N Expression and genomic organization of medaka fish novel membrane form of guanylylcyclase/orphan receptor. *Zool. Sci.* 20: 591-606 (2003).
- 23.0404081321
Koga A, Iida A, Kamiya M, Hayashi R, Hori H, Ishikawa Y, Tachibana A. The medaka fish Tol2 transposable element can undergo excision in human and mouse cells. *J. Hum. Genet.* 48(5): 231-235 (2003).
- 24.0303281406
Kanamori A, Naruse K, Mitani H, Shima A, Hori H. Genomic organization of ZP domain containing egg envelope genes in medaka (*Oryzias latipes*). *Gene* 305(1): 35-45 (2003).
- 25.0408161108
Ohtsuka, M., Kikuchi, N., Yokoi, H., Kinoshita, M., Wakamatsu, Y., Ozatod, K., Takeda, H., Inoko, H., Kimura, M. (2004). Possible roles of *zic1* and *zic4*, identified within the medaka Double anal fin (Da) locus, in dorsoventral patterning of the trunk-tail region (related tophenotypes of the Da mutant). *Mechanisms of Development* 121: 873-882 (2004).
- 26.0408161112
Kimura, T, Jindo, T., Narita, T., Naruse, K., Kobayashi, D., Shin-I, T., Kitagawa, T., Sakaguchi, T., Mitani, H., Shima, A., Kohara, Y. and Takeda, H. Large-scale isolation of ESTs from medaka embryos and its application to medaka developmental genetics. *Mechanisms of Development* 121: 915-932 (2004).
- 27.0602101323
Kage T, Takeda H, Yasuda T, Maruyama K, Yamamoto N, Yoshimoto M, Araki K, Inohaya K, Okamoto H, Yasumasu S, Watanabe K, Ito H, Ishikawa Y. Morphogenesis and regionalization of the medaka embryonic brain. *J Comp Neurol.* 476(3):219-39 (2004).
- 28.0602101329
Kawakami A, Fukazawa T, Takeda H. Early fin primordia of zebrafish larvae regenerate by a similar growth control mechanism with adult regeneration. *Developmental Dynamics* 231(4):693-9 (2004).
- 29.0408161115
Naruse, K., Hori, H., Shimizu, N., Kohara, Y. and Takeda, H. Review. Medaka genomics: a bridge between mutant phenotypes and gene function. *Mechanisms of Development* 121: 629-638 (2004).
- 30.602021144
Yasutake, J., Inohaya, K. and Kudo, A.:Twist functions in vertebral column formation in medaka, *Oryzias latipes*. *Mechanisms of Development* 121, 883-894 (2004)
- 31.602021337
Sakamoto, D., Kudo, H., Inohaya, K., Yokoi, H., Narita, T., Naruse, K., Mitani, H., Araki, K., Shima, A., Ishikawa, Y. et al.:A mutation in the gene for delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) causes hypochromic anemia in the medaka, *Oryzias latipes*. *Mechanisms of Development* 121, 747–752 (2004).

- 32.602021208
Tanaka, K., Ohisa, S., Orihara, N., Sakaguchi, S., Horie, K., Hibiya, K., Konno, S., Miyake, A., Setiamarga, D, Takeda, H. et al.:Characterization of mutations affecting embryonic hematopoiesis in the medaka, *Oryzias latipes*. *Mechanisms of Development* 121, 739-746 (2004)
- 33.602021157
Katogi, R., Nakatani, Y., Shin-i, T., Kohara, Y., Inohaya, K. and Kudo, A.:A Large-scale analysis of the genes involved in fin regeneration and blastema formation in the medaka, *Oryzias latipes*. *Mechanisms of Development* 121, 861-872 (2004)
- 34.0404081639
Koh, D. Inohaya, K., Imai, Y. and Kudo, A.:The novel medaka transglutaminase gene is expressed in developing yolk veins. *Gene Exp. Patterns*. 4, 263-266 (2004)
- 35.0404081632
Kudo, H., Amizuka, N., Araki, K. Inohaya, K. and Kudo, A.: Zebrafish periostin is required for the adhesion of muscle fiber bundles to the myoseptum and for the differentiation of muscle fibers. *Developmental Biology* 267, 473-487 (2004).
- 36.0602092107
Iida A, Inagaki H, Suzuki M, Wakamatsu Y, Hori H, Koga A. The tyrosinase gene of the i(b) albino mutant of the medaka fish carries a transposable element insertion in the promoter region. *Pigment Cell Res.* 17(2): 158-164 (2004).
- 37.0602092205
Iida A, Tachibana A, Hamada S, Hori H, Koga A. Low transposition frequency of the medaka fish Tol2 element may be due to extranuclear localization of its transposase. *Genes Genet. Syst.* 79: 119-124 (2004).
- 38.0602092215
Khorasania MZ, Henniga S, Imrea G, Asakawa S, Palczewska S, Berger A, Hori H, Naruse K, Mitani H, Shima A, Lehrach H, Wittbrodt J, Kondoh H, Shimizu N, Himmelbauer H (2004). A first generation physical map of the medaka genome in BACs essential for positional cloning and clone-by-clone based genomic sequencing. *Mechanisms of Development* 121: 903-913 (2004).
- 39.0602092223
Naruse K, Hori H, Shimizu N, Kohara Y, Takeda H. (2004). Medaka genomics : a bridge between mutant phenotypes and gene function. *Mechanisms of Development* 121: 619-628 (2004).
- 40.0602092229
Sasaki T, Asakawa S, Shimizu A, Ishikawa SK, Imai S, Himmelbauer H, Mitani H, Furutani-Seiki M, Kondoh H, Schartl M, Hori H, Shima A, Shimizu N. Medaka genome mapping and sequencing: Toward complete genome sequence. *Marine Biotech.* 6: S445-S448 (2004).
- 41.0602101336
Kawahara A, Che YS, Hanaoka R, Takeda H, Dawid IB. Zebrafish GADD45{beta} genes are involved in somite segmentation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102: 361-366 (2005).
- 42.0602101344
Shimoda N, Yamakoshi K, Miyake A, Takeda H. Identification of a gene required for de novo DNA methylation of the zebrafish no tail gene. *Developmental Dynamics* 233, 1509-1516 (2005).
- 43.0602101350
Murayama E, Herbomel P, Kawakami A, Takeda H, Nagasawa H. Otolith matrix proteins OMP-1 and Otolin-1 are necessary for normal otolith growth and their correct anchoring onto the sensory maculae. *Mechanisms of Development* 122:791-803 (2005).
- 44.0602101357
Kawakami A, Nojima Y, Toyoda A, Takahoko M, Satoh M, Tanaka H, Wada H, Masai I, Terasaki H, Sakaki Y, Takeda H, Okamoto H. The zebrafish-secreted matrix protein you/scube2 is implicated in long-range regulation of hedgehog signaling. *Current Biology* 15(5):480-488 (2005).
- 45.0602101404
Kimura T, Yoshida K, Shimada A, Jindo T, Sakaizumi M, Mitani H, Naruse K, Takeda H, Inoko H, Tamiya G, Shinya M. Genetic linkage map of medaka with polymerase chain reaction length polymorphisms. *Gene* 19;363:24-31 (2005).
- 46.601311500
Emoto, Y., Wada, H., Okamoto, H., Kudo, A. and Imai, Y.: Retinoic acid-metabolizing enzyme Cyp26a1 is essential for determining territories of hindbrain and spinal cord in zebrafish. *Dev. Biol.* 278, 415-427 (2005).
- 47.0602092031
Inoue K, Sakamoto T, Yuge Y, Iwatani H, Yamagami S, Tsutsumi M, Hori H, Cerra MC, Tota B, Suzuki N, Okamoto N and Takei Y Structural and Functional Evolution of Three Cardiac Natriuretic Peptides. *Mol. Biol. Evol.* 22(12): 2428-2434 (2005).
- 48.0602092036
Iida A, Takamatsu N, Hori H, Wakamatsu Y, Shimada A, Shima A, Koga A. Reversion mutation of ib oculocutaneous albinism to wild-type pigmentation in medaka fish. *Pigment Cell Res.* 18(5): 382-384 (2005).
- 49.0602092046
Iio K, Nakauchi M, Yamagami S, Tsutsumi M, Hori H, Naruse K, Mitani H, Shima A, Suzuki N A novel membrane guanylyl cyclase expressed in medaka (*Oryzias latipes*) intestine. *Comp Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 140(4): 569-578 (2005).
- 50.0602092057
Kurauchi K, Nakaguchi Y, Tsutsumi M, Hori H, Kurihara R, Hashimoto H, Ohnuma R, Yamoto Y, Mastuoka S, Kawai S, Hirata T, Kinoshita M. An in vivo visual reporter system

for detection of estrogen-like substances by transgenic medaka. *Environ. Sci. Technol.* 39(8): 2762-2768 (2005).

51.

Kobayashi, D. Takeda, H. (2006). Development of the endoderm and gut in medaka, *Oryzias latipes*. *Development, Growth and Differentiation*, in press.

52.

Terasaki H, Murakami H, Yasuhiko Y, Shin-i T, Kohara Y, Saga Y, Takeda, H. (2006). Transgenic analysis of medaka *mesp-b* enhancer in somitogenesis. *Development, Growth and Differentiation*, in press.

53.

Kurosawa G, Takamatsu N, Takahashi M, SumitomoM, SanakaE, Yamada K, Nishi K, Matsuda M, Asakawa S, Ishiguro K, KurosawaY, Shimizu N, Kohara Y, Hori H (2006). Organization and structure of *hox* gene loci in medaka genome and comparison with those of pufferfish and zebrafish genomes. *Gene* 2006 (in press).

54.

Tsutsumi M, Imai S, Kyono-Hamaguchi Y, Hamaguchi S, Koga A, Hori H (2006). Color reversion of the albino medaka fish associated with spontaneous somatic excision of the Tol-1 transposable element from the tyrosinase gene. *Pigment Cell Res.* 2006 (in press).

55.

Shimizu N, Sasaki T, Asakawa S, Shimizu A, Ishikawa SK, Imai S, Murayama Y, Himmelbauer H, Mitani M, Furutani-Seiki M, Kondoh H, Scharl M, Nonaka M, Takeda H, Hori H, Shima A (2006). Comparative Genomics of Medaka and Fugu. *Proceedings for TODAI International Symposium of Functional Genomics of Pufferfish - Recent Advances and Perspective -*. *Comp. Biochem. Physiol.* 2006 (in press).

2) データベース

56. 0107

Medaka EST Database

メダカEST、迅速マッピングシステムM-marker、
medaka microarray 8Kの全データを公開

<http://medaka.lab.nig.ac.jp/>