

メダカを用いた顔貌形質の量的形質遺伝子座解析

●新屋 みのり

国立遺伝学研究所系統生物研究センター

<研究の目的と進め方>

顔貌は種毎に固有であり同時に個体識別が可能なほどの多様性を併せ持つ、興味深い形質である。この形質は、その形成に環境要因と遺伝的要因の両方が関わるとされる“複合形質”であり、本研究では顔貌形質の遺伝的要因に迫ることを目的としている。

顔貌形質は、さらに細かい形質あるいは要素（例えば、眼や鼻など各パーツの大きさ・長さ・形、パーツの配置）の集合として捉えることができる。本解析を通じて、1) どのような要素が遺伝の単位となっているのか、2) 要素間にはどのような関係があるのか、また3) 各要素がゲノム上にどのように分布しているのか、さらに4) どのような遺伝子やシグナル伝達経路が各要素に関わっているのか、を明らかにしたい。このように構成要素の遺伝的背景を網羅的に調べることで、全体としての顔貌の遺伝性について理解を深めることを狙う。

具体的には、小型魚類であるメダカをモデルに、顔貌を構成する様々な要素を可能な限り多く抽出する。これらの要素を量的形質として扱い、遺伝統計学的手法によるゲノムワイドな量的形質遺伝子座解析を行う。これにより各形質をメダカゲノム上に貼り付けることができ、顔貌形質に関するゲノム機能領域が明らかとなる。さらに、上記により明らかとなったゲノム機能領域と EST (Expressed Sequence Tag) や突然変異体・疾患の感受性領域など近年急速に蓄積されつつあるゲノム情報とを統合し、顔貌形質に関わる分子的背景に迫る。

<2007年度の研究の当初計画>

本解析に必要なリソースやシステムとして、1) メダカゲノムを網羅した遺伝マーカーと高速なタイピングシステム、2) 解析サンプルとして二つの近交系およびその雑系第一世代 (F₁)・第二世代 (F₂)、3) 高速な形質定量化システムを整えてきた。

これまでに、F₂ 184 個体 (集団1) を用いて23個の顔貌形質に対してゲノムワイドな量的形質遺伝子座解析を実施し、見出した関連領域・形質を別集団184個体 (集団2) にてさらに解析して集団1によるマッピング結果の検証を行った。その結果、10領域中2領域にて集団2による関連の再現が得られた一方で、集団1と2を併せた解析では6領域にて再現が得られた。従って、メダカ近交系を用いた遺伝学的解析により確かにゲノム上の顔貌形質関連領域を見出すことができることがわかったが、同時に F₂ 184 個体程度の解析では検出力がさほど高くないことが明らかとなった。

そこで2007年度には、十分な検出力がある状態での解析を実現することを試みる。そのために、検出力に影響する二つの要因であるサンプル数と遺伝率について検討する。具体的には、①高い遺伝率で形質を定量化する方法の模索と、②解析サンプルの追加を行う。顔貌形質の定量化は、二次元の画像から特徴点座標を

抽出し、特徴点の様々な組み合わせで長さの比を算出することでを行っている。そこで①については、抽出する特徴点と比を求める点の組み合わせを再検討する他、正規化した長さを定量値とした解析や幾何学的手法による形の定量化を行った解析を試みる。これに並行して②として、集団1に適当なサンプル数を追加してゲノムワイドに量的形質遺伝子座解析を行う。また、メダカ自然集団には特徴的な顔貌をしている系統がいくつか見出されており、これらの表現型を詳しく解析することで、顔貌形質のどの要素・方向に対して遺伝的要因が影響しているのかを推定できると期待している。

①にて良好な結果が得られた定量化方法を用いて②の解析を行い、形質間の定量値やゲノム関連領域の関係を詳細に調べる。

<2007年度の成果>

①の検討として、抽出する特徴点および比を求める組み合わせを定めなおし、89形質について集団1にて解析を行った。その結果、66形質のマッピングに成功した。過去の定量方法に比べ、今回の方が20%程度高い割合でゲノム関連領域を見出すことができていた。また、この一連の解析を通じ、1) メダカにおいて顔貌形質の多様性に遺伝的要因が絡むこと、2) メダカ近交系を用い、マウス等他のモデル動物に劣らない検出力にて量的形質遺伝子座解析を実施できることがわかった。これらの成果は論文として発表済みである (0801251546)。

②については、サンプルの追加を行うに当たり、様々な遺伝率におけるサンプル数と検出力との関係を計算した。その結果、368個体の解析で8割程度の検出力を与えることが明らかとなった。そこで、追加するサンプル数を184個体とし (集団2)、集団1と併せた368個体にて解析を行うこととした。集団2について、対象遺伝マーカーのタイピングおよび先述の定量化方法による定量を完了させ、集団1と2を併せてゲノムワイドな量的形質遺伝子座解析を行った。その結果、184個体での解析では最大の LOD スコアが6.2だったが、368個体では7.9となり、またマッピングできた形質の割合も74.2%から90.7%と上昇した。すなわち、サンプル数追加による検出力の改善が確認できた。

自然集団を用いた解析については、特徴的な顔貌を持つ2系統にて10数個体ずつの頭部を撮影し、定量を行った。その結果、これまでに用いた二つの近交系とは分布が大きくずれた形質を複数見出すことができた。しかし、近交系の分布と完全に分かれた形質はなく、従ってメンデル遺伝形質として扱える可能性のある形質は見出せなかった。

<国内外での成果の位置づけ>

本研究は小型魚類であるメダカを世界で初めて量的形質の遺伝学的解析に用いている。従って、ここで得られた成果は複合形質

の遺伝学的解析に対するメダカのポテンシャルを示すことになる。実際に顔貌形質をメダカゲノム上にマッピングした結果から、顔貌形質のように複雑な遺伝様式を示す形質の解析にメダカが有効であることを示すことができた。飼育に必要なスペースやコスト等を考えると、多数の個体を扱った解析を可能にする良い脊椎動物モデルではないかと思われる。また、メダカのF₂集団を用いた時の検出力や必要なサンプル数など、今後の量的形質遺伝子座解析を計画する際に参照とすべき情報を、本解析を通じて提示できたと考える。

形態形質の定量化には、主成分分析を用いた手法や幾何学的手法など、現在様々な手法が提案されている。本解析では特徴点間の距離の比を形質値として用いた。この方法は比較的古典的な方法であるが、直感的であり定量化が容易であるという利点を持つ。また、本解析にて得られたマッピング結果から、検出力の点でも他の手法に劣らない定量方法であることを示すことができた。今後の形態の定量化を行う上で参考となる有用な評価を与えることができたと考える。

また、これまでの量的形質遺伝子座解析では数個程度の形質を扱った解析にとどまっておき、数百という形質を扱ったのは本解析が初めてと言える。今後、一つの現象を多方面から定量した解析はますます必要になると予想され、必然的に多数の形質を扱うことになるであろう。本解析を通じて明らかとなった問題点やその解決策は、そうした解析を成功させるための重要な情報を与えるものである。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

2007年の当初の研究計画では、幾何学的手法による定量値や特徴点間の距離そのものを用い、量的形質遺伝子座解析を実施する予定をしていた。しかし、実際にはそれら定量方法を検討しなかった。その理由としては、特徴点間の距離の比を定量値とした解析において、特徴点・比の取り方を定めなおすことで予想よりも検出力の改善が認められたこと、またその統計解析を完了させるのに時間かかったことの二つがあげられる。時間的な問題については、現在の入手可能な各種ソフトウェアの仕様が原因の一つである。定量化に用いるソフトウェア、形質間の関係を探るための数理解析を行うソフトウェア、関連するゲノム領域を同定するための統計遺伝学的解析を行うソフトウェア、そしてゲノム領域間の関係を解析するソフトウェアのいずれも、多数の形質を扱う仕様にはなっていないことが多い。このため本解析のように扱う個体数と形質数の両方が大きい場合には、非常に時間がかかってしまう。また、生み出された解析結果自体も膨大な量であり、結果の解釈・考察にも時間がかかっていた。尚、支援班のサポートを受けることにより、特徴点間の距離の比を求めるステップから区間マッピング法によるゲノム領域を同定するステップに関しては自動化を進め、これまでの10倍以上の速度での解析が可能となった。

<今後の課題>

上述した、膨大なデータを扱うことによる時間的な問題については、コンピュータ技術を駆使しての解決が必要である。特に、解析結果の解釈や考察をスムーズに進めるための支援ソフトウェアについては原型と言えるものもほとんど無いため、新たな視点を持って開発する必要がある。表現型、遺伝子型、解析結果等の情報を全て格納し、結果を様々な方法にて分類・検索でき、多様

な角度からの表示が可能なビューワーを備えたデータベース的なものが不可欠ではないかと考えている。

本解析により、368個体のサンプル数にて十分な検出力を保った解析が可能になったことがわかった。そこで、今後はこのサンプル数にて解析を進め、形質と関連ゲノム領域の詳細な関係や形質間の関係、そして関連ゲノム領域間の関係などを深く分析し、顔貌形質の遺伝性について詳細を明らかにしたい。

明らかとなった形質関連ゲノム領域から関連する遺伝子を同定するためには、特定のゲノム領域のみを他方の近交系由来のゲノムに置き換えたコンジェニック系統が必要である。本解析では多数の関連ゲノム領域が明らかとなり、従ってコンジェニック系統も多数作成する必要に迫られると予想される。このため、高速にコンジェニック系統を作成するための系の確立が次の大きな課題だと考えている。多少のコストと手間はかかるが、通常の方法の半分程度の期間でコンジェニックを作成できる「スピード・コンジェニック法」がマウスにて知られている。メダカの精子凍結技術とこのスピード・コンジェニック法を組み合わせることにより、1年程度でコンジェニック系統を作成できる系の構築を考案している。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

0801251546

Kimura, T., Shimada, A., Sakai, N., Mitani, H., Naruse, K., Takeda, H., Inoko, H., Tamiya, G., Shinya, M.: Genetic analysis of craniofacial traits in the medaka. *Genetics*, 177, 2379-88 (2007).

2) データベース/ソフトウェア

なし

既知の遺伝マーカーの情報収集およびタイピングは、東京大学大学院理学系研究科の武田洋幸班員、基礎生物学研究所バイオリソース部門の成瀬清班員との共同研究により行った。また、量的形質遺伝子座解析の統計手法開発について、東京大学大学院新領域創成科学研究科の中谷明弘班員と共同研究を進めている。さらに、メダカ自然集団を用いた解析は、東京大学大学院新領域創成科学研究科の三谷啓志班員と共同で行っている。