

統計遺伝学および実験発生学的手法による頭蓋顔面形成機構の解明

●新屋 みのり¹⁾ ◇成瀬 清²⁾

1) 国立遺伝学研究所系統生物研究センター 2) 基礎生物学研究所バイオリソース研究室

<研究の目的と進め方>

頭蓋顔面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も併せ持つ、非常に興味深い形質である。このような頭蓋顔面の多様性を伴う形態形成機構を理解するため、本課題においては頭蓋顔面形質とゲノム・遺伝子そして細胞の関係を明らかにすることを目的としている。

頭蓋顔面を構成する細胞群は、神経外胚葉と表皮の境界に生じる神経堤細胞に由来する。個々の細胞は様々なゲノム領域や遺伝子産物の制御を受けつつ、ダイナミックな動きを伴い全体として“形”を作る。従って、その全体像の理解には、ゲノム・遺伝子、細胞など各階層の構成要素の役割や相互作用を理解するとともに、階層間の関係を総合的に知る必要がある。

そこで、本課題では次の2つのアプローチを行う。一つは小型魚類であるメダカを用いた統計遺伝学的解析である。これまでに我々はメダカ近交系を利用し、1) メダカにおいても頭蓋顔面に多様性があること、2) その多様性には遺伝要因が関わること、3) メダカにおけるQTL (Quantitative Trait Loci) 解析が頭蓋顔面形質など量的な形質の遺伝学的解析に有効であることを示してきた。そこで本解析ではこの手法を用いてゲノム・遺伝子と表現型である頭蓋顔面形態とを結びつけ、さらに、ゲノム領域間の相互作用を明らかにすることを試みる。もう一つのアプローチとしては、同じく小型魚類であるゼブラフィッシュを用いた実験発生学的解析を行う。ここでは、細胞と形態の関係、細胞間および細胞-組織間相互作用を明らかにすることを狙う。具体的には、頭蓋顔面を構成する細胞の系譜を明らかにし、これらの細胞を経時的に追跡することによって、形態形成時の細胞運動を詳細に解析する。さらに、移植や細胞除去等の胚操作を加えることにより、細胞間および細胞-組織間に存在する様々な相互作用を明らかにする。このように二種の小型魚類それぞれの利点を生かした解析を行って相補することにより、頭蓋顔面形成の全体像の把握を目指す。

<2008年度の研究の当初計画>

メダカを用いた統計遺伝学的解析を進める。これまでは頭蓋顔面を定量する方法として、頭部を撮影した画像データから特徴点座標を抽出し、様々な組み合わせで求めた2つの特徴点間の距離の比を定量値とする方法を用いて解析を行ってきた。2008年度は、新たにGeometric morphometricsという定量化手法を試みる。近年開発されたこの手法は形態全体を一つの値で評価しており、1回の統計遺伝学的解析で多数の遺伝子座を見出した実績がある。メダカ近交系であるHNI, Hd-rRの交配により作成した雑系第二世代(F₂) 368個体のサンプル集団を用い、これまでに取得した特徴点座標を入力データとして計算を行って定量値を得る。その値を用いてQTL解析を実施する。さらに、遺伝子座間の関

係を二元配置分散分析や東京大学の中谷明弘班員のグループで開発中の二次元区間マッピング法を適応するなどして解析を行う。

QTL解析により見出された形質関連ゲノム領域から遺伝子の同定を試みる際には、対象とするゲノム領域のみを別の近交系由来に置き換えたコンジェニック系統が必要である。そこで、上述のQTL解析と並行し、複数のコンジェニック系統を速やかに作成するためのシステムの構築・準備を行う。本システムでは、マウスにて提案されたスピード・コンジェニック法による系統作成を前提とする。最初に、この作成法を用いるために必要な遺伝マーカーセット(セットA)を作成する。セットAはメダカゲノムを10 cMに一つ程度の密度でカバーする必要がある。さらに、いずれのゲノム領域を対象としても戻し交配第一世代(BC₁)の作成とセットAの遺伝子型決定が必要であるため、あらかじめ40-50個体のBC₁♂を作成し、その遺伝子型決定と精子凍結を行い、これらの情報をデータベース化しておく。これにより、任意のゲノム領域に対して遺伝子型情報を基に適切な凍結精子を選んで媒精させることが可能となる。すなわち、BC₂の飼育からコンジェニック系統の作成を開始できるため、約1年で系統を樹立できる高速なシステムとなる。2008年度には、セットAの作成とBC₁♂50個体の精子凍結およびサンプリングを行う。

<2008年度の成果>

Geometric morphometricsによるQTL解析については、専用ソフトウェアを走らせるための計算マシンを設置し終え、定量化の計算を実行し始める段階である。また、頭蓋顔面形質の多様性が発生あるいは成長過程でどのように現れるのか探ることを目的に、F₂ 312個体分の受精後10日目、2ヶ月目、4ヶ月目の頭部画像を準備した。今後、これらの画像から特徴点を抽出して定量化を行い、稚魚や幼魚の段階でどの程度の多様性が存在するのか、それらの形質は遺伝性であるのか、さらに成魚の多様性とどのように対応するのかなど解析したい。

メダカにおけるスピード・コンジェニック作成系構築のためのマーカーセットA作成については、以下の手順で進めた。

- ① 手持ちの遺伝マーカーを公開されているメダカゲノム上にマップした。
- ② マーカー間隔が13 cMより大きく空いている領域、および染色体の端が大きくカバーできていない領域を特定した。
- ③ Hd-rRとHNIのゲノム配列を参照し、マーカーが必要とされた領域に新たに候補マーカーを作成した。
- ④ Hd-rR, HNI間で多型があり、共優性なマーカーであることを実験的に確認した。
- ⑤ 遺伝地図上の位置を実験的に確認した。
- ⑥ ④や⑤で候補マーカーが不相当であることがわかった場合には、③からやり直した。

①②の結果、67領域に新規マーカーを設定する必要のあることが判明し、設定を試みた。これまでに52領域に対して設定を終えている。残り15領域についても⑤のステップを進めており、間もなくセットAが完成する予定である。尚、BC₁♂の準備については、Hd-rR系統への戻し交配を行い、現在十分な数のBC₁を飼育中である。そろそろ成熟してきており、近々精子凍結およびDNAサンプリングを行う。

また、本研究にて得られたデータや解析結果などを整理・格納し、さらに解析を補助するための閲覧機能等を含めたデータベースの構築を進めている（中谷明弘班員との共同研究）。

<国内外での成果の位置づけ>

本研究では、300個体以上のF₂を個体識別し、稚魚・幼魚・成魚と発生段階を追って頭部画像を収集した。このように質の高い情報がそろっているデータは珍しく、価値が高い。本データを活用することで、成魚での形態の多様性が現れる過程を捉えることが可能となる。発生・成長過程の中で多様性がどのように生じ、変化するのか、あるいはしないのか、またそれぞれの多様性は遺伝するのか、するのであればその関連ゲノム領域はいつこかなど、興味は尽きない。量的形質をこのように発生学的な視点から捉えた研究はこれまでになく、先駆的な位置にある興味深い研究であると考えている。

現在は未完成であるが、セットAが完成すれば、かなり均一な間隔でメダカゲノムを網羅する遺伝マーカーセットができる。しかも、遺伝子型決定を高速に行うため、セットAは複数マーカーを同時に解析できるシステムに組み上げる予定である。これはコストダウンにもつながり、利用価値がより高まるものと思われる。従って、コンジェニック系統作成時だけではなく、メダカを用いた遺伝学的解析全般に適応できる有用なマーカーセットとなることが期待できる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

Geometric morphometricsによるQTL解析については、マシントラブルが発生したこともあり、計算マシンの準備に手間取ってしまった。そのため若干解析が遅れているが、マシンの設定が完了したので今後は問題なく進められる。

スピード・コンジェニック作成系構築のためのBC₁♂の準備も若干遅れている。これには二つの理由がある。一つは作成しようとしたBC₁2系統のうち、片方の系統で全個体がメスになってしまうというトラブルがあったためである。恐らく、用いたHNI個体1匹が偶然にもXX♂（遺伝的にはメスだが、発生過程で何らかの理由でオスになってしまった）であったためだと考えている。もう一つは戻し交配に用いた近交系であるHd-rRが弱く、予期していたのよりも早く生殖能力を欠いてしまったためである。そこで、新たに系統を増やして飼育しなおし、現在十分な個体数の成熟したBC₁♂が得られている。

<今後の課題>

- 1) Geometric morphometricsによるQTL解析を実施し、頭蓋顔面の多様性形成に関わるメダカゲノム領域を同定する。
- 2) 受精後10日目、2ヶ月目、4ヶ月目の頭部画像の定量化から表現型解析を行う。さらに、遺伝性を確認した後はQTL解

析による関連ゲノム領域の同定を行いたい。

- 3) 中谷明弘班員と共同で進めているデータベースの構築を完了させる。定量値や遺伝子型、QTL解析結果などデータの格納だけでなく、解析を進める際の良きツールとして利用できるよう、集計・閲覧の機能を充実させたい。また、最終的にはデータの公開にも用いる予定である。
- 4) 遺伝マーカーセットAを作り上げる。複数のマーカーを同時に解析できるよう、実験条件の検討を進める。
- 5) BC₁♂の精子凍結およびDNAサンプリングを完了させ、セットAによる遺伝子型決定を行う。こちらに関しても、コンジェニック系統作成時に速やかに適切な凍結精子を選んで使用できるように、遺伝子型情報と凍結精子の保存場所や量をデータベース化したい。
- 6) ゼブラフィッシュを用いての実験発生学的解析を進める。細胞を追跡する解析になるため、ケージ化合物やトランスジェニックゼブラフィッシュの利用が必要である。トランスジェニック魚については、国立遺伝学研究所の川上浩一班員との共同研究により、適切な細胞がラベルされたトランスジェニック系統を探索する。

<成果公表リスト>

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).

量的形質の定量化手法開発および量的形質遺伝子座解析の統計手法開発、そしてデータベース構築について、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、ゼブラフィッシュを用いての実験発生学的解析に関しては、国立遺伝学研究所初期発生部門の川上浩一班員と共同にて解析の準備を始めつつある。