

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>

頭蓋顔面形態は、生命の維持に必須の構造であり種毎に固有である一方で、個体識別が可能ほどの多様性を示す。ヒトの家系を用いた解析から頭蓋顔面形態の個体差に遺伝要因が関わることを示されているが、その詳細は明らかではない。種としての枠を外れない範囲で、ぶれ（多様性）が許される、そしてそのぶれが遺伝性を示す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を示してきた。そこで本解析では、メダカを用いて量的形質遺伝子座解析 (Quantitative Trait Loci analysis: QTL 解析) を行い、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ると共に、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。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。

<研究開始時の研究計画>

メダカを用いての QTL 解析は 2006 年度から 2009 年度にかけての 4 年間行なう予定であった。ゼブラフィッシュを用いた実験発生学的解析は最終年度である 2009 年に行う計画であった。以下に各年度に分けて詳細を述べる。

【2006 年度】

頭蓋顔面形態の QTL 解析には、メダカの近交系である HNI 系統および Hd-rR 系統を用いることにした。研究開始時点で、これらの系統より雑系第二世代 (F₂) 368 個体を作成し、内 184 個体 (集団 1) を用いて QTL 解析を既に行っていた。この時、形質定量化の方法としては、画像として保存したメダカ頭部図から特徴点の座標を抽出して様々な特徴点の組み合わせで特徴点間の距離の比を求め、その値を形質値として用いた。性差がなく近交系間で有意な差がある 23 形質を、5.4 cM に 1 つの密度でゲノムを網羅した遺伝マーカーによりメダカゲノム上にマップし、13 形質に対して 14 領域の形質関連領域を同定していた。

以上の背景を受け、2006 年度には①上記 13 形質のマッピング結果の確認・検証、および②①により確認された関連領域の絞込みを行うこととした。また、更なる絞込みに備え、新たな F₂ 集団 184 個体 (集団 3) の作出も行う予定であった。以下に①②の項目について、当初の具体的な計画を述べる。

① サンプルとしては、作出した F₂ 集団 368 個体の内、集団 1 を除いた残りの 184 個体 (集団 2) を用いる。集団 1 によりマッピングされた 13 形質・14 箇所の関連領域内の遺伝マーカーを対象に、集団 2 にて形質の定量化および遺伝マーカーの遺伝子型の決定を行う。それらのデータを用いて QTL 解析を行い、集団 2 においても集団 1 と同様のゲノム領域が形質関連領域として検出できるか否かを確かめる。

② ①の解析により、集団 2 において集団 1 の結果が再現された形質・関連領域を対象に領域の絞込みを行う。そのためには統計解析の解像度を上げる必要があるため、サンプル数・マーカー密度を上げて解析を行う。サンプル数は集団 1、2 を併せて解析することで倍の 368 個体にする。マーカー密度は関連領域内に遺伝マーカーを追加し、2～3 cM に一つ程度の密度にて解析する。

【2007 年度】

②にて絞り込まれた領域を、さらに 2 段階の方法 (③④) にて小さく絞込むこと、そして⑤それらの領域を物理地図に落とし、ゲノム情報と照合することを計画した。以下に詳細を述べる。

③ マーカー密度を 1cM に一つ程度にまで細かくし、集団 1+2 にて解析を行なうことで絞込みを行なう。そのため、既知マーカーが存在しない領域には、ゲノム情報を参照して新たなマーカーを設定する。

④ 集団 3 も用いることでサンプル数を増やし、絞込みを行なう。集団 1+2+3 の 552 個体にて③で用いたマーカーセットにより QTL 解析を実施する。

⑤ ④の結果、各形質がマッピングされた領域について、メダカゲノム上の EST や変異体のマッピング結果・表現型などの情報を集める。加えて、ゲノムのシntenナーを利用してマウスやフグなど他の動物のゲノム情報やヒトの EST、遺伝子予測結果、疾患のマッピング結果も集め、整理する。収集した情報をもとに、形質の形成に関わっている可能性のある分子やシグナル経路など分子的背景に迫る。

【2008 年度】

当研究課題は公募研究であるため、2006～2007 年度と 2008～2009 年度に分けて計画を立案している。そのため、2008 年度以降の計画は前年度までの解析結果を受けて作成した。①②の結果から、定量方法の検討や絞込みのストラテジーの変更が必要になったことがわかった (詳細は「成果」や「達成できなかったこと」の項に述べる)。そのため、⑥ Geometric morphometrics と言われる新たな定量方法の検討を行ない、⑦コンジェニック系統を用いて絞り込むためにコンジェニック作成系の構築を手掛けることを

予定とした。詳細を以下に述べる。

- ⑥ 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。この度は、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。集団1+2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大学院新領域創成科学研究科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する予定である。
- ⑦ 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ュニック系統が必要である。そこで、上述の QTL 解析と並行し、複数のコンジュ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・コンジュ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、40-50 個体の BC₁ ♀ を作出する。BC₁ は Hd-rR 系統への戻し交配により作出する。

【2009 年度】

2008 年度の⑦の続きとして⑧ BC₁ 雄ストック作成を行なう予定であった。また、⑨ゼブラフィッシュを用いた実験発生的解析を計画した。以下にそれぞれの詳細を述べる。

- ⑧ BC₁ の雄 50 個体程度から精子凍結および DNA 抽出を行い、昨年度設定したセット A を用いて各個体の遺伝子型を決定する。個体番号と凍結精子の保存場所、および遺伝子型情報を関連付け、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元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 の飼育からコンジュ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。
- ⑨ 頭蓋顔面が形成される際の細胞レベルの解析として、ゼブラフィッシュを用いた実験発生的解析を進める。具体的には、ケージド化合物や組織特異的に蛍光タンパク質を発現するトランスジュニック系統を用い、頭蓋顔面を構成する細胞の系譜を明らかにする。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、頭蓋顔面に表現型が認められる変異体の利用や、移植や細胞除去等の胚操作を加えることにより、細胞間および細胞一組織間に存在する様々な相互作用を明らかにする。

<研究期間の成果>

集団 1 の解析を通じて関連が明らかとなった 13 形質 14 領域のうち、5 形質 10 領域を他に先駆けて解析した。

①集団1で得られた結果の検証

5形質について集団2の形質を定量化し、10領域内の遺伝マーカーの遺伝子型決定を行った。これらを用いて、集団2のみ、あるいは集団1+2にてQTL解析を行ったところ、集団2と集団1+2の両方で集団1の結果を再現できた形質・領域が2形質・2領域得られ

た。また、集団2では惜しくも再現できなかったが、集団1+2で再現できた形質・領域が3形質・3領域見つかった。これらの内、形質V23のLG (Linkage Group) 11の領域は、今回の解析で用いた二つの近交系間では約16cMに相当する領域で組み換えが強く抑制されることがわかり、さらなる解析には進めなかった。従って合計3形質4領域（1形質は重複）を関連領域の絞込み実験へと進めた。本検証実験から、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頭蓋顔面形質関連領域を見出すことができることがわかった。また同時に、F₂集団184個体程度の解析では検出力がさほど高くはないことが明らかとなった。また、368個体とサンプル数を倍にしても陽性が再現されない領域が多かったことから、頭蓋顔面形態の定量化の方法が不適当であり、数値化の基準のぶれが大きいのではないかと考えた。従って、より良い解析を目指すには、定量方法の検討およびサンプル数の追加が必要だと考えた。

②関連領域の絞込み

①にて陽性が再現できた4つの関連領域 (LG6, 17, 21, 22) に対し、これまでの平均マーカー間隔である5.4 cMが2 cM程度になるよう遺伝マーカーを倍に増やして解析を行った。遺伝マーカーには既知のESTに基づいて設定されたマーカーを用い、集団1、集団2、集団1+2にてQTL解析を行った。しかし、いずれの集団の解析においても関連領域の絞込みには至らず、マーカー密度およびサンプル数の領域絞込みへの効果は小さいことがわかった。従って、絞込みには新たな方法を考える必要がある。そこで、コンジュニック系統の使用を考えた。しかし、通常のコンジュニック作成系では系統作成だけで数年がかかってしまう。その解決策として2008年度以降にスピード・コンジュニック系統作成系の構築を計画した。

①②の結果を受け、2007年度に当初予定をしていた③～⑤の項目は中止し、2007年度には定量方法の検討として⑩取得する特徴点および比を求める際の特徴点の組み合わせの再検討、を行い、さらに⑪⑩にて定めた定量方法にてサンプル数を368個体にしてQTL解析を実施することにした。また、①の結果から、比ではない新たな定量方法として2008年度に⑥を計画した。以下に各項目による成果の詳細を述べる。

⑩比による定量化の再検討

取得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QTL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)。尚、共同研究として、中谷明弘班員にこの解析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 (0901161637) を構築していただいた。

⑪サンプル数を追加してのQTL解析

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⑩の定量方法による定量化を完了させ、集団1と2を併せてゲノムワイドなQTL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。

⑥ Geometric morphometricsによる定量とそのQTL解析

Geometric morphometricsは形態全体を、情報を落とすことなく評価する方法として、形態の定量化に頻繁に用いられる。比よりも優れた定量方法の探索という意味づけと、比による定量化では取りもろしている形質が無いかの確認、という二つの意味づけの元でこの手法を試みた。専用ソフトウェアを準備し、集団1+2の定量化を行なった。定量化の手順としては1) 特徴点の分布からSuperimposed plotと呼ばれる形の情報のみに変換、2) The thin-plate spline法を用い1)の情報をpartial warpスコアと呼ばれる情報に変換、3) partial warpスコアに対して主成分分析を実行、4) 各成分の値を表現型値として使用、となる。主成分分析にて0.1以上の寄与率を示した主成分についてQTL解析を実施した。その結果、解析した8つの主成分の内7つのマッピングに成功した。最大のLODスコアは7.5であり、比によるQTL解析結果と大差がなかった。また、Geometric morphometricsにて見つかった形質関連領域は、ほぼ比による定量方法の解析結果でカバーされていた。従って、⑩の比による定量方法のために検出しそびれた形質関連座位は無さそうだと判断した。また、「特徴点間の距離の比」という定量方法は古典的であるが、数さえこなせば近代的な手法であるGeometric morphometricsに劣らないことがわかった。

⑫自然集団を用いた予備的な解析

当初の計画には全く無かった解析であるが、この特定領域の班会議を通じて、メダカ自然集団の中に非常に特徴的な頭蓋顔面形態を持つものがあることを知った。近交系と比較して、メンデル遺伝形質に近い形で扱えるような極端に差がある形質が見つければ、マッピングに用いる片方の系統が近交系でなくとも形質関連遺伝子を比較的容易に見つけ出せる可能性がある。そこで、東京大学大学院新領域創成科学研究科の三谷啓志班員にご協力いただき、特徴的な頭蓋顔面形態を持つ2系統にて10数個体ずつの頭部を撮影して定量を行った。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。

⑦⑧スピード・コンジェニック系統作成系の構築

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適当であることがわかった場合には、(3) からやり直した。

(1) (2) の結果、67 領域に新規マーカーを設定する必要があることが判明し、設定を試みた。1 領域のみゲノム情報が間違っているらしく、何度試みても埋めることができない領域があった。14.7 cMに相当するこの領域に関しては諦め、メダカゲノムを8.9 ± 2.5 cMでカバーする187個の遺伝マーカーからなるセット A を完成させた。

BC₁ 雄は100個体以上について精子凍結、およびDNA抽出を行い、内93個体のセット A による遺伝子型決定を行なった。個体番号と遺伝子型情報、凍結保存場所情報はきっちり関連付けした状態でそれぞれ保存されており、いずれのコンジェニック対象領域にも対応できる体制ができた。

⑨ゼブラフィッシュによる解析

頭蓋顔面形態の多様性形成についてゼブラフィッシュにて解析を行うためには、ゼブラフィッシュに遺伝性を示す頭蓋顔面形態の個体差が無くてはならない。そこで、ゼブラフィッシュ成魚において系統間(クローズド・コロニーに相当)で頭蓋顔面形態に差異があるのかを検討した。3つの系統から十数個体ずつ定量化して比較を行なった結果、20-30%の形質で系統差が見出せた。このように少ないサンプル数でも差が見えるということから、解析に十分使用できそうだと考えた。ただし、さらにサンプル数を増やした確認解析が必要である。

では、多様性が形成される時期は発生・成長過程のいつ頃なのだろうか。この疑問に答えるため、近交系化しつつある2系統の頭蓋顔面形態を、発生を追って、数匹ずつではあるが観察を行った。目視の状態でも受精後3日目から系統間に差がありそうなおことがわかった。

以上のゼブラフィッシュに関する解析は、まだまだ予備的な段階であり、今後、サンプル数を増やす、定量化をしっかり行なうなど更なる解析が必要である。ただし、ゼブラフィッシュを用い、頭蓋顔面形態の多様性形成に関する解析が可能であることを示唆している。

<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。実際に頭蓋顔面形質をメダカゲノム上にマッピングした結果から、頭蓋顔面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QTL解析を計画する際に参照となる情報を、本解析を通じて提示できたと考える。メダカには多数の近交系があり、それら近交系間で頭蓋顔面形態だけではなく、脳の形態や行動、椎骨数など様々な形質に系統差があることが知られている。実際に行動および椎骨数に関してはQTL解析が計画されており、その際に本解析結果が良い参照となっているようである。また、メダカを扱っている研究者だけではなく、ゼブラフィッシュ等他のモデル動物を扱っている研究者からも、形態の定量方法やQTL解析によるマッピングの精度、見出した陽性領域の絞込みについてなどの問い合わせをいただいた。本解析について発表した論文に関しては、国内外から反響をもらっている。このことから、重要な情報を発信した成果であったことがわかる。

本研究にて作り上げた、メダカにおけるスピード・コンジェニック系統作成系は、100に近い個体のゲノム全体を網羅した遺伝子型情報と凍結精子を保持している。従って、HNIとHd-rRの組み合わせにて遺伝学的解析を行なっている他の研究に役立てることも可能である。また、染色体1本がHNI由来のBC₁雄が、各染色体につき15-20個体見つかる。これらの凍結精子をHd-rR卵に媒性させ、メダカにおけるコンソミック系統の作成を進めることも可能である。以上のような点から、リソースとしての意味も持ち、利用価値が高い。また、BC₁雄ストックの作成は、

他の系統の組み合わせや他のモデル動物にも適応できる、有用なアイデアであると思っている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

メダカを用いた統計遺伝学的解析については、当初の計画では、集団2により集団1の解析結果を確認した後、解析マーカー密度やサンプル数上げることにより統計解析の解像度を上げ、関連領域をゲノム上のさらに狭い領域へと絞り込む予定であった。しかし、実際にはこれらの要因を倍上げて解析を行っても、解像度はほとんど変わらず、従って関連領域の絞込みは実現できなかった。解像度に影響を与えそうな要因として、マーカー密度とサンプル数を考えていたが、②の結果から、本解析において用いたマーカー密度・サンプル数の振幅では、共に解像度への影響は小さいことがわかった。これは、本研究における解像度の制限要因がマーカー数やサンプル数にあるのではなく、別の要因にあることを意味している。今回の解析で解像度に影響を与える別の要因として最も決定的なものは、用いたサンプル集団内での組み合わせ頻度ではないか、と現在のところ推測している。

ゼブラフィッシュに関する解析への取り掛かりが遅れ、実験発生学的手法を用いて解析する段階に及ばなかった。これは、考えていたよりもメダカの遺伝学的解析に手間取ったからに他ならない。手間取った理由としては、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だと思われる。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しまった。

<今後の課題、展望>

今回はコンジュニック系統の利用によって、形質関連ゲノム領域を絞り込む方針に変更した。しかし、個々の陽性領域に対してコンジュニック系統が必要であり、スピード・コンジュニック系統作成系を用いたとしても、それら一つ一つ作出するのはやはり手間のかかる作業である。従って、長期的には、QTL解析から素早く遺伝子までたどり着くため、ゲノムが細かく入れ替わった集団を、より短時間で作出できるような画期的な技術・手法の開発が必須だと考えている。

また、量的形質の関連遺伝子同定の成否は、現在のところ非常に大きく形質に依存している。多数の個体を扱うため、如何に高速に、そして精度よく形質を定量化できるか、が重要な点である。遺伝子型決定に関してはこれまでの技術開発等により、かなりの高速化、そしてコストダウンが実現された。数百個体のタイピングはさほど大きな負担にはならない。これに比べ、定量化には非常に時間と労力を要している状態である。従って、形質を定量する部分における技術および情報処理の開発が次なる大きな課題だと言える。

前項にて述べたソフトウェアの仕様については、現時点のコンピュータ技術の力で解決可能な問題だと思われる。実際、支援班から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、それまでの10倍以上の速度での解析を進めることが可能となった。近年、扱うデータ量が増えてきていることを意識し、仕様の変更に着手するなど、解析を始

める前に対策を取ることが重要だと思っている。また、今後新たなソフトウェアを開発する際には、この点も考慮して開発に携わるべきだろう。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

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, (2007) 2379-88.

2) 学会発表

新屋みのり：小型魚類を用いた量的形質遺伝子座解析～個体差を解析する～。日本発生生物学学会秋季シンポジウム。2009年11月27～29日。三島。

新屋みのり：メダカを用いた頭蓋顔面形態の遺伝学的解析。日本遺伝学会。2009年9月16～18日。松本。

新屋みのり：魚類頭部形態の定量と遺伝学的解析。定量生物学の会遺伝研キャラバン。2009年3月13, 14日。三島。

新屋みのり、木村哲晃、島田敦子、酒井則良、三谷啓志、武田洋幸、猪子英俊、田宮元、成瀬清：メダカを用いた頭蓋顔面の量的形質遺伝子座解析。日本遺伝学会。2008年9月3～5日。名古屋。

新屋みのり：メダカの量的形質とその遺伝学的解析。日本進化学会夏の学校。2008年8月22～24日。東京。

Shinya, M., Kimura, T., Shimada, A., Sakai, N., Mitani, H., Naruse, K., Takeda, H., Inoko, H., Tamiya, G.: Genetic analysis of craniofacial traits in the medaka. *International conference on zebrafish development and genetics*. June 25-29, 2008. Madison in the U.A.S.

新屋みのり：メダカを用いた頭蓋顔面形質の遺伝学的解析。若いちからシンポジウム。2008年3月5, 6日。名古屋。

Shinya, M., Kimura, T., Shimada, A., Sakai, N., Mitani, H., Naruse, K., Takeda, H., Inoko, H., Tamiya, G.: Genetic analysis of craniofacial traits in the medaka. *European Zebrafish Genetics and Development Meeting*. July 12-15, 2007. Amsterdam in the Netherlands.

3) 図書

Minori Shinya. *Medaka: Model for Organogenesis, Human Diseases and Evolution (Chapter 15 Craniofacial trait)*. Eds: K. Naruse, M. Tanaka and H. Takeda. Springer. (未刊行)

4) データベース/ソフトウェア

901161637 (データベース)

MCTDB: メダカの頭蓋顔面形質の画像データベース。任意に選択した制御点間の距離を目的形質として、値の分布の表示や正規性の検定、区間マッピングによる関連遺伝子座の推定が可能。

<http://medaka.cb.k.u-tokyo.ac.jp/mctdb/>