

## メダカゲノム情報にもとづく脊椎動物染色体再編の比較ゲノム解析

●堀 寛<sup>1)</sup> ◆三谷 啓志<sup>2)</sup> ◆佐々木 貴史<sup>3)</sup> ◆金森 章<sup>1)</sup>

1) 名古屋大学・大学院理学研究科 2) 東京大学・大学院新領域創成科学研究科 3) 慶応大学・医学部

## ＜研究の目的と進め方＞

線虫、ショウジョウバエ、マウス、ヒトなど、巨大なゲノムサイズをもつ動物ゲノムの解読が終了し、そこで開発された方法を用いれば、どのような生物のゲノム解読も、今では可能である。そこで進化的に重要な位置をしめる生物について、ゲノム解読を推進し、その情報をもとに、これらの生物のゲノム比較をすれば、これまで多様に見えた生物界全体が、新たな視点から統合再編され、進化にともなうゲノム内の重要情報の変遷が明かにすることができる。

なかでも脊椎動物の比較ゲノムは脊椎動物特有の器官形成や高次現象を理解し、ヒトそのものの理解を可能にする重要な基盤をはたすと期待されている。さらに2005年、ヒト Haplotype Mapping Project (HapMap プロジェクト) の Phase I が完了し、全ゲノム中で1千万を超える一塩基置換 (SNP) マーカーが開発され、疾患関連遺伝子の同定、薬剤感受性検査などへの SNP マーカー利用目的でデータベースが整備された。しかし、高品位のゲノム情報が整備され、遺伝子の機能解析が可能なモデル生物で、地域集団間 (さらには個体間) の変異を分析する方法論が求められている。

メダカは古典的な遺伝地図や分子マーカーによる遺伝地図作成、それを基にしたゲノムの物理地図の作成の積み重ねが行われており、多くのゲノム多型に富む野生集団と近縁種が遺伝子の実験的機能解析に利用可能な点でこうしたアプローチを可能とするモデル生物である。

本研究課題では、先の特典研究 (ゲノム C) で明らかにされたメダカ WGS (whole genome shotgun sequencing) による全ゲノム概要配列の情報を基盤に魚類を中心にした比較ゲノム解析を行う。そのために、これまでの BAC clone を基本としたコンテグ作成法を、大幅に改良するハイスループットの Clone by Clone (HCBC) 法に発展させ、現在進行中の WGS データを融合させた完成度の高いゲノム決定戦略を構築する。また、ヒト HapMap プロジェクトなどで明らかにされてきた『地理的集団間で遺伝的に大きな差違が観察される遺伝子 (高い Fst 値を示す SNPs を含む遺伝子)』に着目し、これらのメダカ orthologue における多型解析を行う。これにより脊椎動物における多型性の機能的意義と環境適応との関係が推定できる遺伝子のスクリーニングを行う。

## ＜2007年度の研究の当初計画＞

連鎖群1のさらに詳細な解析による体色決定遺伝子 (R: 緋色遺伝子) のポジショナル・クローニングを予定していた。また LG2, LG1 の他生物種の相同部位との比較を検討し、体色決定遺伝子の *r* や *lf* (*leucophore-free*: 白色素胞欠損変異) の候補遺伝子を推定することも計画した。このように構成遺伝子の数、種類をヒトや哺乳類ゲノムと比較することにより、脊椎動物進化の過程

で染色体の再編がどのようにおきて、現在の染色体が成立したのか、概観する。また多数の挿入反復配列を分類することによって、ゲノム内に蓄積したトランスポゾンの挙動をすることができる。さらにメダカゲノム多型解析を進める目的で、日本および周辺地域 (韓国、中国、フィリピン、インドネシア) の27集団 (29検体) についてシーケンスを基礎とした SNPs 開発を行なう。ヒトで高い Fst 値を示すアミノ酸置換を起こす SNPs を含む遺伝子を対象にメダカ地域集団間での SNPs を検出し、集団遺伝学および分子進化的解析手法を用い、正の自然選択が働いてきたか検定する。アミノ酸置換をもたらす SNP が発見された遺伝子について、集団間の発現パターン比較と、遺伝子発現をノックダウン等による表現型への効果を直接検証することで、その遺伝子の機能解析をおこなうことを計画していた。

## ＜2007年度の成果＞

ヒト (アフリカ人、ヨーロッパ人、東アジア人) で高度に遺伝的地域集団分化を示す SNPs を含む遺伝子 (30 座位以上) の中からデータベース内で遺伝子のアノテーションが明確で、メダカゲノム中の相同遺伝子と orthologue 対応関係が明らかなターゲット12 遺伝子座位 (32 プライマーペア増幅断片) を選別し、高 Fst-SNP を含むエキソン周辺領域について、メダカ野生集団で PCR 直接塩基配列決定を行った。その結果、複数の遺伝子で特徴的地域差を示すアミノ酸置換を生じる塩基置換が発見された。これらの遺伝子では、(1) ヒトで地域間に違いのある同じアミノ酸残基の違いがメダカで観察されたもの、(2) 比較したエキソン配列で非同義置換・同義置換の比 (dN/dS ratio) を算出したところ有意な差がみとめられ、それら非同義置換が地域集団分化と完全に対応しているもの (正の自然選択の可能性を示唆するもの) が観察された。いずれの遺伝子も、マウスを使った実験等で環境適応と関係している可能性が指摘されている。これらの結果からヒトで環境適応と関連する遺伝子はメダカでも環境適応に何らかの役割を担っている可能性が示唆された。

また分担者の佐々木らは LG21 のメダカ染色体を clone-by-clone 法で配列決定し、その報告を行った。これによりメダカの配列とヒト、マウス、タキフグ間でのシンテニー構造が確認された。また LG21 のメダカ染色体上に同定された遺伝子群のその90%以上がヒトにそのホモログが存在することも判明した (Sasaki et al. 2007)。

フグとの比較でゲノムサイズの変化がどのような原因かを推定することが可能となった。フグゲノムはその全長が約400 Mb、メダカゲノムは800 Mbで、両者は約二倍の差が存在する。LG21 のメダカ染色体のうち約10 Mb について両者を詳しく比較した結果、それに対応するフグゲノムは約5 Mb と半分のサイズであるにも関わらず、存在する遺伝子数は変わらなかった。遺伝子以

外の部分はその長さを減少しており、しかもその相違は全長に平均していた。これは両者の差が短い多数の indel の挿入、欠失のためである。これらを明かにして報告した (Imai et al. 2007)。メダカの *hoxAa* と *hoxAb* は硬骨魚類が出現した後、重複した *hox* cluster の一つである。哺乳類では *hoxA* クラスターは1つしか存在していない。これを見ても分かるように、ゲノム進化の原動力であるゲノム重複の意義を調べるには、この *hox* の系は典型的なモデル系となる。哺乳類の *hoxA* クラスターの *AbdB* family に属する *hox9* ~ *hox13* の遺伝子群は、マウスやニワトリの系で研究され、四肢の原基で筋肉組織と間充組織で両者を区別することなく発現していることが知られている。これに対してメダカにおいて、これらメダカの *AbdB* family genes は、*hoxAa* cluster と *hoxAb* cluster では大きくその発現が相違していた。これらは肢芽ではその筋肉組織と間充組織との間に別々に分化して発現し、哺乳類や鳥類よりも、より進化した発現様式をしめしていた (Takamatsu et al. 2007)。

#### <国内外での成果の位置づけ>

メダカの WGS genome の発表 (Kasahara M et al., Nature 447, 714 (2007)) 以来、メダカを使用した遺伝解析が格段に容易になっている。その影響か、メダカの発生学にはたず役割は上昇しており、我々の研究課題である *hox* cluster gene に限っても米国内の研究グループがその重複と関連して、鰓弓部の発生での発現解析のためにプローブの譲渡依頼等がある。成果の公表については NBRB 主催のメダカ国際学会 (3月) 等での公表を予定している。

#### <達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

メダカ染色体のうち、緋色遺伝子は連鎖群 1 に存在するため容易に結果がえられない。現在、BAC の物理地図を詳細に解析し、さらにこれに WGS の scaffold データを組み合わせて STS マーカーの数を増やしている。これにより BAC のクローズは終了し、一応コンテイングマップは完成した。しかしながらこの領域は WGS genome database で検索、検討し近縁種間比較などとしても容易に物理地図を完成させることができない。さらなる STS マーカーの開発を急いでいる。

#### <今後の課題>

メダカを使った生体機能解析は、ヒトでは不可能なそうした種内変異 (多型) の生物学的意義を明らかにしうるであろう。一方、多型によってはメダカでの表現型が明らかでないものもあり、こうした遺伝子については、交雑実験などによりどのように解析を進めていくかが今後の課題である。

#### <成果公表リスト>

- 0801291449 Takamatsu N, Kurosawa G, Tanaka M, Takahashi M, Inokuma R, Kanamori A, Hori H (2007). Duplicated *Abd-B* class genes in medaka *hoxAa* and *hoxAb* clusters exhibit differential expression patterns in pectoral fin buds" *Develop. Genes Evol.* 217 : 263-273.
- 0801291501 Imai S, Sasaki T, Shimizu A, Asakawa S, Hori H, Shimizu N (2007). The genome size evolution of medaka (*Oryzias latipes*) and fugu (*Takifugu rubripes*). *Genes Genet. Syst.* 82 : 135-144.
- 0705071509 Yokoi H, Shimada A, Carl M, Takashima S, Kobayashi D, Narita T, Jindo T, Kimura T, Kitagawa T, Kage T, Sawada A, Naruse N, Asakawa A, Shimizu N, Mitani H, Shima A, Tsutsumi T, Hori H, Wittbrodt J, Saga Y, Ishikawa Y, Araki K, Takeda H (2007). Mutant analyses reveal different functions of *fgfr1* in medaka and zebrafish despite conserved ligand-receptor relationships. *Dev. Biol.* 304(1), 326-37.
- 0702141841 Sasaki T, Shimizu A, Ishikawa SK, Imai S, Asakawa S, Murayama Y, Khorasani MZ, Mitani H, Furutani-Seiki M, Kondoh H, Nanda I, Schmid M, Schartl M, Nonaka M, Takeda H, Hori H, Himmelbauer H, Shima A, Shimizu N. (2007). The DNA sequence of medaka chromosome LG22. *Genomics* 89(1):124-133.