

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¹⁾ ◆三谷 啓志²⁾ ◆佐々木 貴史³⁾ ◆金森 章¹⁾

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＞

線虫やショウジョウバエ、マウスやヒトなど、巨大なゲノムサイズをもつモデル動物の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、今では概要配列レベルであれば可能である。そこで進化的に重要な位置をしめる生物について、この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だろう。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。

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、本研究課題では、先の特定研究（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。これによって脊椎動物遺伝子の構造と機能の共通性、普遍性を明らかにしてゆきたい。

一方、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。これにはヒト集団内でのミトコンドリアゲノムの地理的多型が一つのモデルとなりうるが、一方で 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とも興味深い。多くのゲノム多型に富む野生集団と近縁種が存在し、ゲノムの理解が進んでいるメダカは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。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。

＜2008年度の研究の当初計画＞

堀、金森はメダカのゲノム情報を利用することで、とりわけ性分化に関与する遺伝子の同定とその発現を性分化発生過程で追う事を計画した。

また三谷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をもとに、メダカのアルビノ IV 型の原因遺伝子が MATP であることを同定したが (Fukamachi *et al.* (2001), *Nature Genet.*, 28 :381-

385)、その原因遺伝子が真の責任遺伝子であるか否か、そのレスキュー実験を計画した。また遺伝的に種内多型に富む野生集団を利用できるメダカの利点を用いて、ミトコンドリアゲノムの種内多型と遺伝子群の環境適応的動態を解析した。

佐々木は CGC (Conserved gene cluster) データベースから遺伝子領域に存在するメダカの non-coding conserved region (NCR) を抽出し、その領域に結合する転写因子タンパクの同定を試みた。

＜2008年度の成果＞

堀、金森は性分化に関与する遺伝子の同定とその発現を性分化発生過程で追う事を計画し、とりわけメダカ生殖腺の初期発生で最も早く発現される転写因子の一つである fig-alpha に注目した。この fig-alpha が卵細胞成熟に必須の zpc 4 や zpb の発現を支配している事や、減数分裂を支配する遺伝子 scp3 の発現と同調していることを明らかにした。さらに fig-alpha 遺伝子の発現を支配しているシス配列部分を同定する目的で、代表的な脊椎動物のゲノム比較を行った。フグ、カエル、マウス、ヒトでは fig-alpha 翻訳領域は保存されているが、保存度の高いシス配列は検出されなかった。配列の相似度はなかったが、この遺伝子のフグ fig-alpha の 5' 領域をもつ GFP でその活性をしらべた結果、メダカ卵内でもフグ配列は正常に機能することが判明し、配列の相似性によらない転写活性領域の共通性が示唆された。

三谷らはメダカのアルビノ IV 型原因遺伝子 MATP について、その原因遺伝子が真の責任遺伝子であるか否か、レスキュー実験で検証した。当初、MATP と呼ばれていた遺伝子は今日、solute carrier family 45 member 2 (slc45a2) と呼ばれている。この slc45a2 cDNA と 5' 上流領域からなるトランスジェニック遺伝子を構築し、これをアルビノメダカに注入することで機能回復することに成功した。さらにこの 5' 上流領域の部分のどの領域が眼色素細胞特異的な発現を支配し、皮膚の色素細胞ではどの領域が重要であるか、発現の支配領域を同定することに成功した。

また三谷はメダカ種内地域集団由来の代表的系統と近縁種についてミトコンドリアゲノム全配列を決定して、東韓国集団に特異的なミトコンドリア上の遺伝子逆位を見つけた。また、ミトコンドリアにコードされる tRNA 遺伝子のうちに地域集団特異的な種内多型の位置がヒト遺伝子でも相同位置でも同様に高頻度の多型を示すものがあることを確認した。ミトコンドリア調節領域の種内多型性についても検討したところ、この領域内に近縁種にはみられない繰り返し配列がメダカに存在し、その繰り返し数が北日本集団、南日本集団のいずれでも高緯度になるほど多くなる傾向が見られた。繰り返し数の大きく異なる系統を低温順化して比較したところ、繰り返し数に相関のある発現誘導がみられるミトコンドリアにコードされる遺伝子が存在することを確認した。現

在ミトコンドリアを置換した系統を交配により作製し、低温応答に関する影響を調べている。

佐々木らは前年度に作成したプログラムを用いて CGC (Conserved gene cluster) データベースから遺伝子領域に存在する non-coding conserved region (NCR) を抽出した。そのうち 4 転写因子が存在する CGC から NCR 領域をピオチン化プライマーで PCR 法を用いて増幅し、相互作用タンパク質同定のため HeLa 細胞抽出液を加えた。これらをストレプトアビジンビーズを用いて分離し、SDS 電気泳動及び銀染色を用いて解析した結果、NCR に相互作用するタンパク質が検出された。現在、相互作用タンパク質の解析を行っている。

<国内外での成果の位置づけ>

メダカ研究の特性である性分化と体色決定の研究を進める上で、重要な進展があった。*slc45a2* 発現の制御は脊椎動物に共通の支配機構と考えられ、ヒトの体色の多様さについて重要な貢献をなすと、注目されている。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

ヒトで地域間に違いのある核遺伝子については、メダカの遺伝子群について、温度の影響を受けやすい遺伝子群が予想されたが、その分離同定に手惑っている。地理的關係とかならずしも一致していない。

<今後の課題>

ヒトで地域間に違いのある核遺伝子に注目し、同じアミノ酸残基の違いがメダカで観察された遺伝子を選び出し、これらの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) がすでに観察されている。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。今後は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いたい (三谷)。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング

- 0901151332 Kanamori, A., Toyama, K., Kitagawa, S., Kamehara, A., Higuchi, T., Kinoshita, M., and Hori, H. (2008). Comparative genomics approach to the expression of *fig α*, one of the earliest marker genes of oocyte differentiation in medaka (*Oryzias latipes*). *Gene* 423:180-187.
- 0901151343 Kinoshita, M., Okamoto, G., Hirata, T., Shinomiya, A., Kobayashi, T., Kubo, Y., Hori, H., and Kanamori, A. (2009). Transgenic medaka enables easy detection of oocytes in live fish. *Molec. Reprod. Develop.* 76:202-207.
- 0901160052 Ito, M., Shikano, T., Oda, S., Horiguchi, T., Tanimoto, S., Awaji, T., Mitani, H., and Miyazaki, S. (2008). Difference in Ca²⁺ oscillation-inducing activity and nuCLEAr

translocation ability of PLCZ1, an egg-activating sperm factor candidate, between mouse, rat, human, and medaka fish. *Biol. Reprod.* 78 (6) : 1081-1090

- 0901160025 Fukamachi, S., Kinoshita, M., Tsujimura, T., Shimada, A., Oda, S., Shima, A., Meyer, A., Kawamura, S., and Mitani, H. (2008). Rescue from oculocutaneous albinism type 4 using medaka *slc45a2* cDNA driven by its own promoter. *Genetics* 178 (2) : 761-769.
- 0901160041 Hirayama, M., Ahsan, M.N., Mitani, H., and Watabe, S. (2008) CYR61 is a novel gene associated with temperature-dependent changes in fish metabolism as revealed by cDNA microarray analysis on a medaka *Oryzias latipes* cell line. *J Cell Biochem.* 104 (4) : 1297-1310.

- 2) データベース/ソフトウェア
なし