

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), 4)} ◆三谷 啓志²⁾ ◆清水 厚志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) 慶應大学・医学部 4) 名古屋大学遺伝子実験施設

<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を明ら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 (*Oryzias latipes*) 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、普遍性を明らかにすることを目的とした (堀, 金森)。

佐々木と清水は、ヒトゲノムプロジェクトにおいて BAC クローン を遺伝子地図上に整理した後、一つ一つのクローン配列を決定していく Clone by Clone (CBC) 法によるヒト 21 番、22 番、8 番染色体の解読に貢献し、その過程においてゲノム内の遺伝子同定および解析システムを構築した。そこで、これらの CBC 法によるメダカゲノムシーケンシングをここでも計画した。染色体 1 本 1 本を完全解読することにより、詳細な染色体再編のメカニズムの解明が可能となると考え、メダカゲノム情報をヒトやマウスのゲノムと比較し、染色体の進化にともなうゲノム内重要情報の変遷を検討することとした。

三谷とそのグループは、種内変異の分子メカニズム解明をめざして、メダカとヒトのゲノム比較を以下のような方法で進めることを計画した。ヒトを含む 15 種を超える脊椎動物において全ゲノム配列ドラフトがデータベース上で全て (もしくは一部) 公開され、利用可能となっている。さらに 2005 年、ヒト Haplotype Mapping Project (HapMap プロジェクト) の Phase 1 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そのデータベースが整備された。これらの SNP マーカーは、ヒトの疾患関連遺伝子の同定や、薬剤感受性検査によるテーラーメード医療の開発などへ利用可能である。こうしたゲノム医学的展開は、分子生物学の立場から言えば、ヒトの種内変異を分子レベルで明らかにする試みに相違ない。しかし、ボディープランなど、生命の大枠を決定する分子メカニズムを調べるためのモデル生物は既に存在するものの、種内変異といった地域集団差 (さらには個体差) を分析するためのモデル生物は脊椎および無脊椎動物において未だ確立されていない。種内変異の分子メカニズム解明を進めるにあたり、適した生物種の条件は、1) 野生種の採取

が比較的容易であり、2) 飼育のノウハウおよびインフラが研究機関に整っていて、3) 全ゲノム配列が決定されている、の 3 点である。メダカはこれら 3 つの条件を全て満たした理想的な生物種と考えられる。

メダカは日本およびその周辺国に分布する広温域性の魚類であり、南北に伸び連なる日本列島に生息する各地の野生集団は、大きく異なる温度条件下に曝されている。国内の野生集団は大きく 2 つの地域集団、北および南日本集団に分けられ、先の研究によりこれら 2 集団の温度適応能は細胞レベルで異なることが示唆されている。また、これら 2 集団由来近交系を対象としたゲノム解析の結果、種内変異が非常に大きいことが明らかにされた。そこで本研究では、各地から分離したメダカ野生集団の多型性と環境適応との関連を明らかにすることを目的とした。ミトコンドリアゲノムを各地の集団間で比較し、地理的分布との関連を検討した。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。これによりメダカ野生種内で検出された多型の機能的意義と環境適応との関係を解析する。

<研究開始時の研究計画>

堀、金森はメダカの BAC ライブラリーやフグ、ゼブラフィッシュ、マウス、ヒトのゲノム情報を利用することで、形態形成のマスター遺伝子である *hox* 遺伝子群に着目し、その遺伝子構造を明らかにし、発現パターンの比較を行い、*hox* 遺伝子群にみられる大規模な遺伝子重複、とりわけ、脊椎動物が陸上化するにあたって重要な役割を担う四肢の形成に関与する *AbdB* 遺伝子群に注目して解析することとした。また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。

また三谷ら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の解析を以下のように計画した。

[1] メダカ野生集団のミトコンドリア多型性を明らかにし、地理的分布との関連を解析する。また野生メダカ地域集団内および間の遺伝的多様性を塩基配列データから集団遺伝学的に比較する。

[2] ヒトで高い Fst 値を示すアミノ酸置換を起こす SNPs を含む遺伝子のうち既に得られているメダカ DNA 配列 (27 地域集団・29 検体・12 遺伝子座位・32 増幅断片) の集団遺伝学および分子進化的解析手法を用い、調べた遺伝子に正の自然選択が働いてきたか検証する

佐々木と清水は、ここで、先行の特定研究で三谷らとともに報告したメダカ cDNA ライブラリーを用いて作成した EST マーカーにより、メダカ染色体連鎖群 22 番 (LG22) が比較的遺伝子密度が高く、染色体サイズも小さいと考えられたため、これを最初の配列決定の対象とした。

<研究期間の成果>

1) *hox* 遺伝子群にみられる遺伝子重複の意義 (堀, 金森)

我々ヒトやマウスは A, B, C, D の 4 本の *hox* 遺伝子クラスターを持ち、これによって初期発生のプランが決定される。しかしメダカやフグ、ゼブラフィッシュなど硬骨魚類内の条鰭類では、その *hox* 遺伝子は、下図のように 7 つのクラスターを形成し、重複し倍加している。哺乳類では *hoxA* クラスターは 1 つしか存在していないが、メダカでは *hoxAa* と *hoxAb* にクラスター重複がみられる。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* の系は典型的な良いモデル系であろう (図 1)。

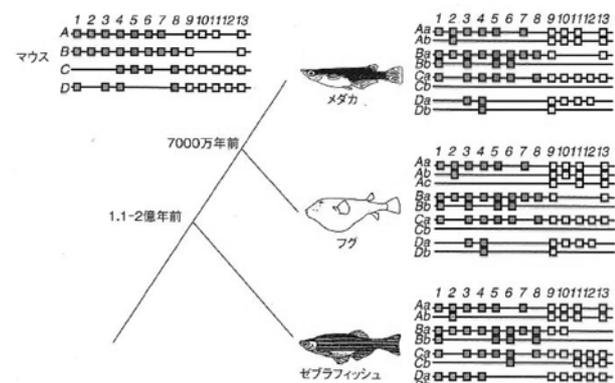


図 1 条鰭魚類の *Hox* クラスターの比較。マウスやヒトの A, B, C, D の 4 クラスターに対し、魚類では各クラスターが倍化し a, b のサブクラスターを生じた。その後ゼブラフィッシュは Db を、メダカ・フグは Cb クラスターを失い、7 クラスター構造となった。

哺乳類の *hoxA* クラスターの *AbdB* family に属する *hox9* ~ *hox13* の遺伝子群は四肢形成のマスター遺伝子である。マウスやニワトリの系でよく研究され、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た。つまり哺乳類や鳥類よりも、より分化 (進化) した発現様式をしめしていた (Takamatsu et al. 2007)。この遺伝子重複により条鰭類魚類において *hox* cluster 単位のより複雑な遺伝子支配が可能となったことを示している (図 2)。

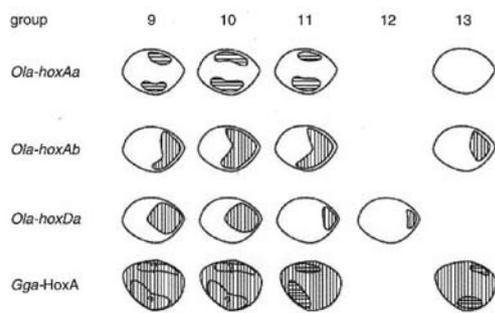


図 2 肢芽における *Hox* 遺伝子群 *AbdB* 族の発現比較。左の *Ola-hoxAa*, *Ola-hoxAb*, *Ola-hoxDa* はそれぞれメダカ *hoxAa* 群, *hoxAb* 群, *hoxDa* 群を表し、上段の group に各遺伝子の番号が表記されている。たとえば、左上段の肢芽は *hoxA9a* 遺伝子の発現その右となり *hoxA10a* 遺伝子の発現となる。肢芽の左側が前、右側が後、上が頭側、下が背側。Gg-HoxA はニワトリ *HoxA* の肢芽での発現を示す。*Ola-hoxAa* 群の発現は筋肉組織に対応する *MyoD* の発現場所に、*Ola-hoxAb* 群の発現場所は間充組織となった。Gg-HoxA 群ではそのような発現の分化はみられない。また *Ola-hoxDa* と Gg-HoxD には明確な発現相違はなかった。これは *Ola-hoxDb* には *AbdB* 族としては *hoxD9b* のみのためかもしれない (Takamatsu et al., 2007)。

2) メダカの性分化支配遺伝子 (堀, 金森)

さらに堀、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。

3) メダカのゲノム重複の特徴 (堀, 金森)

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 と半分サイズの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)。

4) メダカの新規アルビノ遺伝子 (三谷)

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球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。

5) メダカの遺伝的地域分化 (三谷)

また三谷ら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、まず、遺伝的に異なる日本国内外の 8 野生集団および 4 近交系、計 12 個体の mtDNA 全長塩基配列を決定し、詳細に配列比較した。その結果、東韓集団由来近交系 HSOK の mtDNA は偽遺伝子を含み、その遺伝子配置はその他 11 個体のものと異なることが明らかとなった。これは同集団で起こった当該遺伝子領域が縦列重複に由来するものと考えられた。また、mtDNA の複製およびコード遺伝子の転写に関与する mtDNA 制御領域において、11 塩基を単位とする機能未知の反復配列が存在することが明らかとなり、その反復数は各野生集団間で異なっていた。

そこで、各集団採取地の各種気象データの最近 32 年間の平均と上記反復配列数との相関を網羅的に調べたところ、北日本集団では低温への適応の指標である平均最低気温、年間最低気温および平均気温が 0°C 以下の年間日数等、および季節的温度変化への適応の指標である年間最低最高気温の差と明確な相関がみられた。南日本集団では急激な温度変化への適応の指標である年間降水量および降水量が 30 mm 以上の年間日数等と相関がみられた。興味深いことに、高温への適応の指標である平均最高気温、年間最高気温および最高気温が 30°C 以上の年間日数等の気象データ

とは相関がみられなかった。次に、北および南日本集団からそれぞれ2集団、計4つの野生集団の成体各4個体を5℃および25℃で3週間飼育後、背側骨格筋を採取した。mtDNAにコードされる *NADH dehydrogenase 1 (ND1)*、*cytochrome oxidase I (COI)* および *ATPase 6 (ATP6)* 遺伝子を対象に低温移行に伴う相対 mtDNA および mRNA 蓄積量の変化を定量的 PCR 解析により調べた。その結果、上記3遺伝子ともに相対 mtDNA 量はどの野生集団でも飼育温度による変化を示さなかったが、相対 mRNA 蓄積量は、各遺伝子において温度による変化量に野生集団間でバラつきがみられ、そのうち *COI* 遺伝子の値は反復配列数と相関する傾向を示した。地理的に隔離されたメダカ野生集団が特有の遺伝的形質を保有し、特に mtDNA 制御領域内の反復配列がこれらメダカの生息温度環境への適応と関連することが示唆された。

Katsumura et al. (2009) では、野生メダカ地域集団内および間の遺伝的多様性を塩基配列データから算出し、メダカの多型スクリーニングにおいて、deme-based sampling (生殖単位にもとづく試料抽出) 法より grid-based sampling (地域代表を仮定する試料抽出) 法のほうが、より多くのバリエーションを得るには効率がよいことを明らかにした。同時に、grid-based sampling 法では singleton を over estimate することもデータは示しており、自然選択の検出では deme-based sampling 法も同時に行う必要が示唆された。

また、Matsumoto et al. (2009) では、メダカの grid-based sampling 法により、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 (高い F_{st} 値) を示す SNPs を含む遺伝子 (30 座位以上) の中、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 プライマーベア増幅断片) について、高 F_{st} -SNP を含むエキソン周辺領域を増幅するプライマーを設計し、メダカ 27 地域集団 (北日本 4 集団、西韓国 2 集団、中国 1 集団、東韓国 2 集団、南日本 15 集団、外国メダカ 3 種) 29 検体で PCR 直接塩基配列決定を行った。その結果、ヒト集団で高い地域分化が明らかになっている多型が、メダカ集団でも高い地域分化をしているケースが THEA と RTTN の 2 座位存在することを明らかにした。これは、ヒトで正の自然選択を受けてきた可能性のある遺伝子が、メダカでも平行的に正の自然選択を受けてきた可能性を示しており、脊椎動物に共通した環境適応と関係していた可能性のある遺伝子の発見につながると思われる。

6) メダカ染色体LG22の解説 (佐々木、清水)

LG22 にマップされた 55 個の EST マーカーを用いて、メダカ BAC ライブラリーからデジタルスクリーニング法により BAC クローンを選別した。得られた BAC の末端シーケンシングを行い、STS マーカーとすることで隣接するクローンを選別し、LG22 をほぼカバーする BAC コンティグマップを作成した。得られた BAC を複数選択し、Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) 法により、LG22 であると確認できた BAC をアンカーにして 127 個の BAC ショットガンクローンを作成し、常法により BAC クローン毎に配列決定を行った。

最終的に 18,803,338 bp (18.8 Mb) の連続配列を決定し、633 個のタンパクコード遺伝子を同定した。633 個の遺伝子のうち、95% はヒトにその相同遺伝子が存在し、これによりヒトのゲノム配列と染色体レベルで比較することも可能となり、脊椎動物における染色体の再編を明らかとした。

メダカゲノムの全長は約 800 Mb、フグゲノムは約 400 Mb であり、両者には約二倍の差が存在する。そこで、メダカゲノムの 0.1%

にあたる 800 kb をフグゲノムと比較したところ、当該領域には同数のタンパクコード遺伝子が存在するにも関わらず、対応するフグゲノムのサイズは 400kb であり、明らかに異なっていた。さらに詳細なアライメントを行ったところ、フグゲノムとメダカゲノムのゲノムサイズの相違は、フグゲノムに反復配列が顕著にすくないという点だけでなく、互いに相同性を持たない広範な非遺伝子領域でメダカに挿入あるいはフグに欠失が生じていることが判明した。

7) NCRの同定と機能解析 (佐々木、清水)

完成したメダカ LG22 のアノテーションデータを用いてヒトゲノムとの比較を行ったところ、多数の Conserved Gene Cluster (CGC: 遺伝子の順番及び方向を完全に保っているクラスター) が観察された。そこで、ゲノム解読時に構築したメダカ LG22 Ensembl データベースから CGC 領域を抽出し、新たにメダカ LG22 CGC データベースを構築した。次に、CGC に含まれるメダカ遺伝子のヒトオルソログ対応表を作成し、対応するヒト遺伝子のゲノム配列データ及び遺伝子位置情報データを Ensembl ver.48 から抽出するプログラムを作成した。メダカ CGC とヒト CGC 間の配列比較を行い、脊椎動物間で高度に保存されている non-coding conserved region (NCR) を抽出した。抽出には BLASTZ を用いたが、BLASTZ の結果は、表として出力されることや遺伝子領域と非遺伝子領域を区別する事はできない。そこで、遺伝子情報を追加した結果を容易に判断するために、BLASTZ の結果を図示するプログラム BLAST-dotter K を開発した。

解析の結果から LG22 に 4 転写因子が近接して存在する CGC が存在したため、この領域をモデルとした。機能解析の方法としては NCR のエンハンサー/サイレンサー活性あるいはゲノム構造保持への役割を検討するため、当該領域に結合するタンパク質の同定を試みた。同領域の NCR をビ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 PCR 増幅ゲノム断片に加えた。ストレプトアビジンビーズを用いて DNA をトラップし、SDS 電気泳動及び銀染色を用いて解析した結果、NCR に相互作用すると考えられるタンパク質のバンドが多数検出された。

8) NCRのトランスジェニックによるエンハンサー機能活性の検討 (清水)

遺伝子領域周辺に存在し、高度に保存された NCR は遺伝子発現制御機能があると推定される。そこで、エンハンサー活性機能を測定するため、GFP 上流に NCR を挿入した発現コンストラクトを構築し、トランスジェニックメダカを作製することで測定を試みた。まず、前項と同様に 4 転写因子が近接して存在する CGC から抽出した NCR を gateway エントリーベクターに挿入した。続いて合成最小プロモーターを持つ GFP 上流に組み込んだところ蛍光は全く確認できなかった。そこで、*c-fos* 最小プロモーター、*tk* 最小プロモーターを検討したところ、*tk* 最小プロモーターのみで蛍光が観察された。さらに導入された NCR のエンハンサー活性を定量的に測定するため、同一発現コンストラクト上に 2 つの発現ユニットをもつ共発現コンストラクトを構築した。これにより、マーカーとなる蛍光 (RFP) を指標にエンハンサー活性 (GFP) の定量を行うことが可能となった。

<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す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、国際誌への投稿、NBRB 主催のメダカ国際学会、小型魚類研究会等で発表した。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

環境適応に関わりが示唆された遺伝子の同定に時間がかかったために近交系統を遺伝的背景にもつコンジェニック系統の作製に時間的に着手できなかった。現在低温耐性の系統間の差異を解析している (三谷)。

21 年度に計画した NCR 結合タンパク質の同定は分担者である佐々木の異動により、達成が困難であると思われたため計画を中断した (佐々木, 清水)。

メダカの 800 Mb 程度の巨大なゲノムを決定することは容易な作業ではない。今日、多数の生物でゲノム配列が決まったと喧伝されているが、その実態はほとんどが概要配列であり、WGS のデータのみが登録されているのが現状である。これのみでも非常に有用ではあるが、変異をおこし、表現形をスクリーニングし、その責任遺伝子を同定するという遺伝学の常道を用いるには、WGS だけでは十分とは言えず、モデル生物として十分役割を果たせるまでにはいたっていない。この点、古典遺伝学の確固たる基盤があるメダカにおいて、WGS が完成し、さらに LG22 についてその完全配列が完成したことは、今後のゲノムサイエンスに新しい方式を示した点で意義が大きい。まず WGS が存在し、そのデータを遺憾なく利用できる状況は、今後は従来よりも格段、容易に BAC のコンテイング地図を完成させることが可能となったと言える。このモデル系をメダカが完成したということは、ゲノム解読の効率化の道の一つ新たに示したと言える (佐々木, 清水)。

<今後の課題、展望>

上記コンジェニック系統を作成し、遺伝子の機能解析を行う。また、Tilling 法によりノックアウト系統を作製して表現系を解析する必要がある。集団間のアミノ酸非同義が活性に及ぼす影響を解析する。現在、南日本集団と北日本集団の F1 作製の際、雌雄を入れ替えることで核ゲノムが同様でミトコンドリアゲノムの異なる個体を得た。これらの低温耐性を解析している。

これまでの南北日本集団由来の 2 種類近交系統のゲノム多型データに加えて、ボトルネック効果を排除するために次世代シーケンサーを用いた 10 系統ほどの野性系統のトランスクリプトーム解析を行う。これにより、アミノ酸非同義置換をさらに網羅的にスクリーニングできる。またストレスにตอบสนองする遺伝子を RNA シーケンスにより系統間で比較することによりメダカの環境適応に係わる遺伝子を同定することが期待される。

メダカドラフトゲノム配列 (WGS) の解読発表から 2 年が経った。先行したドラフト配列のデータ公開からゲノム解読発表当初にかけてモデル生物として国内外から着目されてきたが、ギャップが多く、ドラフトゲノムの精度は現時点でも連鎖解析後の変異同定に必ずしも十分では無い。すでにヒトモデルとして高い地位を占めているマウス、脊椎動物モデルとして特に米国にて研究者が多いゼブラフィッシュと比べても、miRNA や cDNA の登録が少ない、組み換え生物作成技法の選択肢が少ない、ゲノム基盤の整備が足りないという問題がある。このため、メダカの利点であるゲノムサイズの有用性や近交系、ENU 変異体ライブラリーの存在が十分に有効活用はされていない。

全長 cDNA は NBRP の成瀬らによって登録が進み、次世代シーケンサーによる miRNA のシーケンシングなども国内研究者によって進められているが、基盤となる HdrR のゲノムはドラフトのまま進められていない。我々が本研究課題で達成した BAC を基礎としたゲノムシーケンシングは完成度の高いゲノムには最適かつ唯一の方法であるが、大量安価にシーケンスデータを排出する次世代シーケンサーが主流の今日ではコスト、作業量/期間、人員等の点から今後メダカ全ゲノムに CBC 法を適用することは事実上極めて困難である。また、LG22 の CBC データと WGS データの統合も果たされていない。しかし、現在台頭してきている次世代シーケンサーを用いた新規解析手法はすべからず正確なりファレンス配列の存在を前提としており、モデル生物としてメダカの今後の発展のためには完成度の高いリファレンスゲノム配列は必須である。

今後においても応用課題ばかりを追求するのではなく、ゲノム配列の整備という基礎にも重点を於いた研究を進める必要があると考える。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文

1. 0912031609

Hashimoto H, Miyamoto R, Watanabe N, Shiba D, Ozato K, Inoue C, Kubo Y, Koga A, Jindo T, Narita T, Naruse K, Ohishi K, Nogata K, Shin-I T, Asakawa S, Shimizu N, Miyamoto T, Mochizuki T, Yokoyama T, Hori H, Takeda H, Kohara Y, Wakamatsu Y.

Polycystic kidney disease in the medaka (*Oryzias latipes*) pc mutant caused by a mutation in the *Gli-Similar3 (glis3)* gene.

PLoS One. 4(7): e6299 (2009).

2. 0907011736

Katsumura, T., Oda, S., Mano, S., Suguro, N., Watanabe, K., Mitani, H., Oota, H., Kawamura, S. Genetic differentiation among local populations of medaka fish (*Oryzias latipes*) evaluated through grid- and deme-based sampling. *Gene* 443: 170-177 (2009).

3. 0907011721

Matsumoto, Y., Oota, H., Asaoka, Y., Nishina, H., Watanabe, K., Bujnicki, J.M., Oda, S., Kawamura, S., Mitani, H. Medaka: a promising model animal for comparative population genomics. *BMC Res Notes* 2: 88 (2009).

4. 0901151343

Kinoshita, M., Okamoto, G., Hirata, T., Shinomiya, A., Kobayashi, T., Kubo, Y., Hori, H., Kanamori, A. (2009). Transgenic medaka enables easy detection of oocytes in live fish. *Molec. Reprod. Develop.* 76:202-207 (2009).

5. 0901160041

Hirayama, M., Ahsan, M.N., Mitani, H., Watabe, S. *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: 1297-1310 (2008)

6. 0901151332

Kanamori, A., Toyama, K., Kitagawa, S., Kamehara, A., Higuchi, T., Kinoshita, M., Hori, H. 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 (2008).
7. 0901160052
Ito, M., Shikano, T., Oda, S., Horiguchi, T., Tanimoto, S., Awaji, T., Mitani, H., and Miyazaki, S. 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 (2008).
8. 0901160025
Fukamachi, S., Kinoshita, M., Tsujimura, T., Shimada, A., Oda, S., Shima, A., Meyer, A., Kawamura, S., and Mitani, H. Rescue from oculocutaneous albinism type 4 using medaka *slc45a2* cDNA driven by its own promoter. *Genetics* 178: 761-769 (2008).
9. 0801291449
Takamatsu N, Kurosawa G, Tanaka M, Takahashi M, Inokuma R, Kanamori A, Hori H. 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 (2007).
10. 0801291501
Imai S, Sasaki T, Shimizu A, Asakawa S, Hori H, Shimizu N. The genome size evolution of medaka (*Oryzias latipes*) and fugu (*Takifugu rubripes*). *Genes Genet. Syst.* 82 : 135-144 (2007).
11. 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. Mutant analyses reveal different functions of *fgfr1* in medaka and zebrafish despite conserved ligand-receptor relationships. *Dev. Biol.* 304, 326-337 (2007).
12. 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. The DNA sequence of medaka chromosome LG22. *Genomics* 89 (1):124-133 (2007).
13. 0702141835
Yu JF, Fukamachi S, Mitani H, Hori H, Kanamori A. Reduced expression of *vps11* causes less pigmentation in medaka, *Oryzias latipes*. *Pigment Cell Res.* 19(6): 628-634 (2006).
14. 0702141832
Fukamachi S, Wakamatsu Y, Mitani H. Medaka double mutants for color interfere and leucophore free: characterization of the xanthophore-somatolactin relationship using the leucophore-free gene. *Dev. Genes Evol.* 216(3):152-157 (2006)
15. 0702141827
Hirayama M, Mitani H, Watabe S. Temperature-dependent growth rates and gene expression patterns of various medaka *Oryzias latipes* cell lines derived from different populations. *J. Comp. Physiol.* 176(4): 311-320 (2006).
16. 0701121523
Tsutsumi M, Imai S, Kyono-Hamaguchi Y, Hamaguchi S, Koga A, Hori H. Color reversion of the albino medaka fish associated with spontaneous somatic excision of the *Tol-1* transposable element from the tyrosinase gene. *Pigment Cell Res.* 19(3): 243-247 (2006).
17. 0701121527
Sakaguchi S, Nakatani Y, Takamatsu N, Hori H, Kawakami A, Inohaya K, Kudo A. Medaka unextended-fin mutants suggest a role for *Hoxb8a* in cell migration and osteoblast differentiation during appendage formation. *Dev. Biol.* 293(2):426-38 (2006).
18. 0701121517
Kanamori A, Yamamura A, Koshiba S, Lee JS, Orlando EF, Hori H. Methyltestosterone efficiently induces male development in the self-fertilizing hermaphrodite fish, *Kryptolebias marmoratus*. *Genesis* 44(10):495-503 (2006).
19. 0701121402
Iwai T, Yoshii A, Yokota T, Sakai C, Hori H, Kanamori A and Yamashita M. Structural components of the synaptonemal complex, SCP1 and SCP3, in the medaka fish *Oryzias latipes*. *Exp. Cell Res.* 312(13):2528-2537 (2006).
20. 0701121355
Kondo M, Hornung U, Nanda I, Imai S, Sasaki T, Shimizu A, Asakawa S, Hori H, Schmid M, Shimizu N, Schartl M. (2006). Genomic organization of the sex-determining and adjacent regions of the sex chromosomes of medaka. *Genome Res.* 16(7):815-26 (2006).
21. 0608091804
Kurosawa G, Takamatsu N, Takahashi M, Sumitomo M, Sanaka E, Yamada K, Nishi K, Matsuda M, Asakawa S, Ishiguro K, Kurosawa Y, Shimizu N, Kohara Y, Hori H. Organization and structure of *hox* gene loci in medaka genome and comparison with those of pufferfish and zebrafish genomes. *Gene* 370, 75-82 (2006).
22. 0602021145
Inoue K, Sakamoto T, Yuge Y, Iwatani H, Yamagami S, Tsutsumi M, Hori H, Cerra MC, Tota B, Suzuki N, Okamoto N and Takei Y. Structural and functional evolution of three cardiac natriuretic peptides. *Mol. Biol. Evol.* 22(12): 2428-2434 (2005).
23. 0602021203
Iida A, Takamatsu N, Hori H, Wakamatsu Y, Shimada A, Shima A, Koga A. Reversion mutation of *ib* oculocutaneous albinism to wild-type pigmentation in medaka fish. *Pigment Cell Res.* 18(5): 382-384 (2005).
24. 0602021318

Iio K, Nakauchi M, Yamagami S, Tsutsumi M, Hori H, Naruse K, Mitani H, Shima A, Suzuki N. A novel membrane guanylyl cyclase expressed in medaka (*Oryzias latipes*) intestine. *Comp Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 140(4): 569-578 (2005).

25. 0602021329

Kurauchi K, Nakaguchi Y, Tsutsumi M, Hori H, Kurihara R, Hashimoto H, Ohnuma R, Yamoto Y, Mastuoka S, Kawai S, Hirata T, Kinoshita M. An in vivo visual reporter system for detection of estrogen-like substances by transgenic medaka. *Environ. Sci. Technol.* 39(8): 2762-2768 (2005).

26. 0602021335

Henrich T, Ramialison M, Wittbrodt B, Assouline B, Bourrat F, Berger A, Himmelbauer H, Sasaki T, Shimizu N, Westerfield M, Kondoh H, Wittbrodt J, MEPD: A resource for medaka gene expression patterns, *Bioinformatics* 21(14): 3195-3197 (2005).

27. 0602021342

Klüber N, Kondo M, Herpin A, Mitani H, Schartl M. Divergent expression patterns of *Sox9* duplicates in teleosts indicate a lineage specific subfunctionalization. *Dev. Genes Evol.* 215: 297-305 (2005).

28. 0602021350

Kimura T, Yoshida K, Shimada A, Jindo T, Sakaizumi M, Mitani H, Naruse K, Takeda H, Inoko H, Tamiya G, Shinya M. Genetic linkage map of medaka with polymerase chain reaction length polymorphisms. *Gene* 363: 24-31 (2005).

29. 0602021356

Fukamachi S, Yada T, Mitani H. Medaka receptors for somatolactin and growth hormone: phylogenetic paradox among fish growth hormone receptors. *Genetics* 171: 1875-1883 (2005).

2) 学会発表

M. Hirayama, Takahiko Mukai, Toshikazu Yamashita, Masaki Miya, Mutsumi Nishida, Shugo Watabe, Shoji Oda, Hiroshi Mitani: The functional relationship of the tandem repeats in mitochondrial DNA control region to environmental adaptation in Medaka *Oryzias latipes*. 36th International Congress of Physiological Sciences, July 2009, Kyoto.

M. Hirayama, Nazmul Ahsan, Hiroshi Mitani, Shugo Watabe: The identification of CYR61 as the gene up-regulated in a medaka *Oryzias latipes* cell line upon a response to low temperatures as revealed by cDNA microarray analysis. 5th World Fisheries Congress, October 2008, Yokohama.

H.Oota, Y. Matsumoto, Y. Asaoka, H. Nishina, K. Watanabe, J. M. Bujnicki, S. Oda, S. Kawamura, H. Mitani: Are genes that are highly diversified between human populations also variable in the medaka populations? The Society for Molecular Biology and Evolution, Annual Meeting (Jun. 5 -8, 2008 Barcelona, Spain)

Makoto Hirayama, Mitani Hiroshi, Shugo Watabe: Gene expression profiles for medaka *Oryzias latipes* associated with cold and warm temperatures in cDNA microarray. Society for

Experimental Biology Annual Main Meeting, July 2005, Barcelona.

(国内分省略)

3) 図書

1. 高松尚文、堀 寛. 脊椎動物のゲノム進化. 「海洋の生命史」(西田睦編) 14章、東海大学出版会 (2009) 420p.

2. 堀 寛. 小型魚類がわかる. 「研究をささえるモデル生物—実験室いきものガイド」(吉川寛・堀寛編)、化学同人 (2009) 262p.

3. 深町昌司 三谷 啓志 (2005) メダカゲノムから脊椎動物の遺伝子機能を探る 海洋生物の機能 (竹井 祥郎編) 海洋生命系のダイナミクス 東海大学出版会

4. Mitani, H., Kamei, Y., Fukamachi, S., Oda, S., Sasaki, T., Asakawa, S., Todo, T., Shimizu, N. (2006) The Medaka Genome: Why we need the multiple fish models in vertebrate functional genomics. *Genome Dynamics* vol2. "Structure and Evolution of Vertebrate Genomes" Edited by Volff JN. Karger Publishers Basel p.165-182. 受付番号: 0702061056

4) データベース/ソフトウェア

2005年7月、分担者の佐々木らにより、慶應義塾大医学部分子生物学教室で決定したメダカ純系種HNI/HdrRのBACクローンに関して、末端DNAシーケンス 38,004 エントリーが下記のサイトを通じて公開された。

検索サービス(BLAST) MBBase

(http://mbase.bioweb.ne.jp/~dclust/mb_base.html)

日本DNAデータバンク (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)

(Accession No. DE105280-DE143283)

5) 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

なし

6) 新聞発表、その他顕著なもの

なし