

メダカ近縁種の BAC ライブラリー作成とメダカゲノム情報による物理地図作成

●成瀬 清¹⁾ ◆酒泉 満²⁾

1) 基礎生物学研究所バイオリソース研究室 2) 新潟大学自然科学系

＜研究の目的と進め方＞

メダカ近縁種の BAC ライブラリーを構築する（平成 19 年度はインドメダカとハブスメダカを中心に研究をおこなう）とともに、特定領域研究「統合ゲノム」を中心に解析されてきたメダカゲノム情報を利用することで、近縁種の特定領域を構成する BAC クローンを迅速に同定し、それらのクローンをもちいて DNA フィンガープリント法により近縁種同祖領域の物理地図を作成する方法を開発する。この方法が確立すれば魚類でみられる高いシクニの保存性を利用し、他の多くの魚類でも BAC 物理地図が作成できると考えられる。これによって必ずしも十分なゲノム情報や遺伝子地図がない魚類でもかなり大きな領域の塩基配列レベルの解析が可能となると期待できる。

＜2007 年度の研究の当初計画＞

BAC ライブラリー作成では、ルソンメダカに引き続き、本年度は、昨年度完成したインドメダカ整列化 BAC ライブラリーをもちいて 3D PCR スクリーニング系の樹立をおこなう。またハブスメダカ（インドメダカと同じジャワメダカグループに属するが ZZ-ZW 型の性決定システムをもつ）の BAC ライブラリー及び Fosmid ライブラリーを作成する。

近縁種での性染色体遺伝子地図作成では、メダカ近縁種のさらに詳細な性染色体地図の作成をおこなう。性染色体が同定できた 7 種（ルソンメダカを除く）についてはさらに多くの個体を遺伝子タイピングすることで、性決定遺伝子が存在する領域を絞り込む作業をおこなう。

ゲノム DNA ライブラリーが完成した近縁種（ルソンメダカとインドメダカ）ではクローンの単離と DNA フィンガープリントによる物理地図の作成及びミニマムタイピングパスを構成する BAC クローンを選択をおこない、塩基配列を決定するクローンを選択するとともに、塩基配列の決定をおこなう。

サザン法による重複遺伝子の探索ではメダカ性決定遺伝子 *DMY* で見られたように、重複遺伝子が転移することで、新規の性決定遺伝子が誕生するという可能性を考えて、近縁種をもちいてその性決定領域に由来するゲノム断片をプローブとして、サザンハイブリダイゼーションによって、挿入配列の有無を解析する。

＜2007 年度の成果＞

インドメダカ BAC ライブラリー作成

インドメダカでは性転換雌 (XY) と正常雄 (XY) を交配させることによって XX 胚、XY 胚、YY 胚を得ることが出来た。それぞれの 1 個体から由来する 16 種の培養細胞系を独立に樹立した。それぞれの培養細胞からゲノム DNA を抽出して遺伝子タイピングをおこない XX 胚 YY 胚に由来する培養細胞系を 4 系統 (XX, YY を 2 系統ずつ) 樹立した。支援班の協力によって、XX 培養細胞と YY 培養細胞からそれぞれ独立に BAC ライブラリーを作成した。それぞれ IMBX 及び IMBY ライブラリーと名付け、384 プレート 96 枚に整列化させるとともに、それぞれのライブラリーを 3D 化することで PCR によるクローン同定システムを構築した。これらの BAC ライブラリーは現在 基礎生物学研究所及び新潟大学で保存されている。

ルソンメダカ XX 個体由来の BAC ライブラリーと YY 個体由

来の Fosmid ライブラリーをもちいたルソンメダカ性決定領域の物理地図作成とショットガンシーケンス

平成 18 年度に作成したルソンメダカ X 染色体を含む LMB ライブラリーをもちいて、X 染色体側の性決定領域を完全にカバーする 4 つのクローンを同定したが、4 クローン全てについてショットガン法により塩基配列を決定することができた。その領域に含



まれる遺伝子は基本的にメダカ相同染色体領域に含まれる遺伝子と同様であった（イントロン及び遺伝子間領域ではルソンメダカ特異的あるいはメダカ特異的配列もかなり存在する）。平成 18 年度に作成した YY 個体由来する Fosmid ライブラリーをスクリーニングするために X 染色体相同領域の塩基配列をもとにプライマーを約 40kbp ごとに作成し、YY 個体由来のゲノム DNA をもちいて PCR をおこなった。その結果、全てのプライマーで相同領域を増やすことができた。このことはルソンメダカではメダカで見られたような転座による大きな遺伝子断片の挿入は考えにくいことを示唆している。次にルソンメダカ YY 個体由来する Fosmid ライブラリーを PCR 増幅した DNA 断片をプローブとして、Y 染色体上の性決定領域を含むクローンをスクリーニングした。その結果ルソンメダカ性決定領域を Fosmid クローンにより完全にカバーすることができた。これによりルソンメダカ性決定領域の X 染色体と Y 染色体それぞれをカバーする物理地図を作成することができた。現在は Y 染色体領域をカバーする Fosmid クローンの塩基配列をショットガンシーケンス法によって決定している。また Y 染色体に由来する Fosmid クローンをもちいてトランスジェニックを作成することで性転換をおこなうクローンの同定をおこなっている。

インドメダカ性決定領域の詳細な連鎖地図作成

昨年度はインドメダカ性決定領域を 7 マーカーで 1.4M bp の範囲に絞り込むことができたが、個体数とマーカー数を増やすことで今年度はさらに約 300 K bp の領域に性決定領域を絞り込むことができた。十分に狭い範囲に性決定領域を絞り込むことができたことにより、マップされたマーカーをプローブとして PCR 法により当該領域全体をカバーする物理地図作成をおこなうことができるようになった。

インドメダカ BAC ライブラリーをもちいた物理地図の作成

インドメダカ性決定領域の最近傍領域にマップされた4つの連鎖マーカーをもちいて、今年度作成したIMBYライブラリーをまずスクリーニングした。その結果3種のBACクローンと2種のFosmidクローンによって当該領域の物理地図を作成することが出来た。現在はクローンを支援班に送ることでショットガンシークエンスによる塩基配列決定をおこなっている。

ハブスメダカ性決定システムと分化した性染色体の同定

ハブスメダカ性連鎖マーカーをもちいて以前作成したハブスメダカ/ジャワメダカF1個体から作成したFosmidライブラリーより性に連鎖するクローンを単離した。単離したクローンをプローブとして染色体FISHをおこなうことでハブスメダカ性染色体を同定した。ハブスメダカはZZ-ZW型の性決定システムをもつことが性転換体の交配と性連鎖マーカーの単離で明らかとなっているがFISH法によってZとW染色体をそれぞれ同定したところ、2種の染色体を形態的に区別することができた。W染色体はDAPIで濃染される部分を持ち、Z染色体よりも大きいことが明らかとなった。この結果はメダカ属では、性染色体の形態レベルでの分化に関する初めての報告である。

<国内外での成果の位置づけ>

メダカゲノム配列の決定は特定領域研究「統合ゲノム」を中心におこなわれてきた。2007年6月にはゲノム解析の結果をNature誌に発表することができた。このメダカゲノム解析と詳細な遺伝子地図の作成によって、メダカはすでにゼブラフィッシュとならぶ基軸モデル動物となったと言える。ゲノムワイドな突然変異体の誘発実験もおこなわれ今後、続々とメダカをもちいた新規遺伝子機能の同定が進むと考えられる。実験動物としてのメダカを考えると、その特徴として近縁種の系統関係と種分化に関する研究が古くからおこなわれてきたことがあげられる。これらの研究を通して、メダカの姉妹系統のみならず、10種をこえる近縁種が国内に集められてきた。これらの種は、近年のメダカゲノム情報の蓄積に伴い、性決定領域や海水適応など生命システムの変化(進化)がどのようなメカニズムに担われているのかを、具体的な塩基配列情報の変化として同定するための、重要な材料となりつつある。

近縁種ゲノムリソースとしてのBACライブラリーの作成では、2005年に支援班の協力によってルソンメダカBACライブラリー(LMBライブラリー)を完成させることができた。また本年度はインドメダカBACライブラリー2種も作成することができた。メダカBACライブラリーを加えると系統が異なる近縁種3種でBACライブラリーを作成することができたことになる。メダカでは興味ある遺伝子を含むクローンをウェブ上で同定することができる。またルソンメダカとインドメダカでは3次元PCRスーパープールによるクローンの単離システムを作成することもできた。これらのリソースをもちいてルソンメダカではX染色体とY染色体それぞれから性決定領域を完全にカバーするクローンを同定し、X染色体側ではその領域の塩基配列を決定することができた。またYY個体から作成したfosmidライブラリーからもY染色体性決定領域をカバーする物理地図を作成することができた。インドメダカでもY染色体上の性決定領域を完全にカバーする物理地図を作成することができた。このように今回作成したメダカ近縁種BACライブラリーは、進化にともなう形質進化をなうゲノム上の配列を同定する重要なリソースとなると考えられる。またメダカ性決定システムと性染色体の解析からメダカ属には様々な程度の性染色体進化を示す種が含まれることが明らかとなってきた。今後これらの種を用いた研究から性染色体進化の初期過程に関する興味深い知見が得られると期待できる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

ハブスメダカではZZ個体由来するFosmidライブラリーを

作成することはできたがW染色体を含むライブラリーをまだ構築できていない。これはハブスメダカでは性転換がおこらないためにWW個体を作成することが困難なためである。さらにBACライブラリーについてはいまだ作成することができない。今後は紫外線照射精子を用いて半数体胚を作成し、1個体ごとに半数体胚由来の培養細胞系を樹立することでZ及びW染色体を区別してライブラリー作成を作成する必要がある。ハブスメダカではZ及びW染色体が形態的に異なるために性決定遺伝子近傍での組換えが抑制される傾向にある。このため、性決定領域を遺伝的に絞り込むことが難しいと考えられる。どのようにして性決定遺伝子の候補を絞り込むかについて再度考える必要がある。本年度予定していたゲノムサザン法による挿入配列の有無を確認する実験はルソンメダカ、インドメダカの2種とも物理地図のサイズがXとY染色体ともにほとんど同じであったのでおこなわなかった。

<今後の課題>

インドメダカ、ルソンメダカに続きハブスメダカ及びジャワメダカのBACライブラリー作成を計画している。ハブスメダカとジャワメダカはメダカ属内でこの2種のみがZZ/ZW性決定システムをもつ。またこれら2種の外群であるインドメダカがXX/XY型の性決定システムをもつことを考えるとXX/XYからZZ/ZW型へのシステム変化がハブスメダカとジャワメダカの共通祖先で起こったことが考えられる。これらのシステム変化を担う領域を何らかの方法で明らかにする必要がある。ハブスメダカの性決定領域はメダカではほぼ3Mbp程度に当たることから、網羅的にその領域に含まれるクローンを単離するシステムを考える必要がある。

<成果公表リスト>

1) 論文/プロシーディング (査読付きのものに限る)

1. 0801222032

Evolution of ZZ/ZW and XX/XY sex-determination systems in the closely related medaka species, *Oryzias hubbsi* and *O. dancena*. Takehana, Y., Naruse, K., Hamaguchi, S., and Sakaizumi, M. *Chromosoma* 116, 463-470 (2007)

2. 0801230108

The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. Kasahara, M., Naruse, K., Sasaki, S., Nakatani, Y., Qu, W., Ahsan, B., Yamada, T., Naoyasu, Y., Doi, K., Kasai, Y et al. *Nature* 446(7145), 714-719 (2007)

3. 0707232354

Evolution of different Y chromosomes in two medaka species, *Oryzias dancena* and *O. latipes*. Takehana, Y., Demiyah, D., Naruse, K., Hamaguchi, S. and Sakaizumi, M. *Genetics* 175:1335-1340 (2007)

4. 0801231322

Evidence for different origin of sex chromosomes in closely related medaka fishes: Substitution of the master sex-determining gene. Tanaka, K., Takehana, Y., Naruse, K., Hamaguchi, S., and Sakaizumi, M. *Genetics* 177, 2075-2081 (2007)