

メダカ近縁種ゲノム基盤の整備とそれを用いた新規遺伝子機能獲得機構の解明

●成瀬 清¹⁾ ◆酒泉 満²⁾ ◇井上 広滋³⁾

1) 基礎生物学研究所 2) 新潟大学自然科学系 3) 東京大学海洋研究所

<研究の目的と進め方>

既にゲノムリソースを整備したメダカ近縁種（インドメダカ、ルソンメダカ）とは異なり ZZ-ZW 型の性決定システムをもつハブスメダカとジャワメダカを対象として BAC ライブラリー等のゲノムリソース整備を行う。この研究によって XX-XY から ZZ-ZW システムへの進化を担うゲノム上の塩基配列変化を同定する。これまでの解析からハブスメダカの性決定遺伝子は LG5 上にあるとともに Z 染色体と W 染色体は形態的に異なることが示されている。またジャワメダカでは LG16 に性決定遺伝子が連鎖していることが明らかとなっている。ポジショナルクローニング法と近年の研究から明らかになってきた「性決定機構と生殖細胞の増殖が極めて強くカップルしている」という知見に基づき、細胞増殖との関連が示唆される因子を網羅的に探索する候補アプローチを組み合わせて性決定遺伝子の同定をおこなう。ジャワメダカはメダカ近縁種の中では唯一の海棲種である。この種は海水中の環境汚染物質を検出できるモデル系としての近年多用されるようになってきた。このことを考えるとジャワメダカのゲノムリソースを整備することで、BAC 相同組換えを利用した遺伝子導入個体の作成等も容易になり環境モニタリングシステムとしてのジャワメダカの利用が促進できると考えられる。また淡水/海水適応の分子的基盤についても塩類濃度調節に関与する遺伝子を網羅的に検索することで明らかにできると考えられる。

<2008 年度の研究の当初計画>

ハブスメダカからの培養細胞系の樹立と BAC ライブラリー作成（基礎生物学研究所）

1) 培養細胞の樹立と Z 染色体と常染色体のみを含む BAC ライブラリー作成

ハブスメダカ胚から 1 個体ごとに複数の培養細胞系を樹立する。樹立した培養細胞の一部から DNA を抽出して、すでに開発したハブスメダカの性染色体を区別できる DNA マーカー（Z と W 染色体間で多型を示すマーカー）により遺伝子タイピングをおこなうことで ZZ 胚由来の培養細胞系を同定する。支援班の援助により Z 染色体と常染色体のみを含む BAC ライブラリーを樹立する。

2) 半数体胚をもちいた培養細胞の樹立と W 染色体と常染色体のみを含む BAC ライブラリー作成

インドメダカやルソンメダカと異なりハブスメダカではテストステロンをもちいた性転換雄を作成することはできなかった。そこで今回は半数体胚をもちいた培養細胞系の樹立をおこなう。200J/m²の紫外線を照射した精子を用いて人工授精をおこなうと、全ての胚が半数体として発生を開始する。半数体胚はそのままでは孵化しないが、培養細胞系に移すことで細胞としては生存させることが出来る。培養を続けると半数体細胞の中からエンドサイトーシスにより 2 倍体化する細胞があらわれ、そのまま 2 倍体として培養することが出来る。この現象をもちいて培養細胞系を樹立する。培養細胞系が樹立された後に上記と同様に遺伝子タイピングを行うことで W 染色体と常染色体を持つ培養細胞系を同定し、支援班の援助によって W 染

色体を含む BAC ライブラリーを作成する。

ジャワメダカ培養細胞系の樹立と BAC ライブラリー作成（基礎生物学研究所）

1) 培養細胞の樹立と Z 染色体と常染色体のみを含む BAC ライブラリー作成

ジャワメダカ胚から 1 個体ごとに複数の培養細胞系を樹立する。樹立した培養細胞の一部から DNA を抽出して、すでに開発したジャワメダカの性染色体を区別できる DNA マーカー（Z と W 染色体間で多型を示すマーカー）により遺伝子タイピングをおこなうことで ZZ 胚由来の培養細胞系を同定する。この培養細胞をもちいて支援班の援助によって BAC ライブラリーを樹立する。

2) 半数体胚をもちいた培養細胞の樹立と W 染色体と常染色体のみを含む BAC ライブラリー作成

ハブスメダカと同様に半数体胚から培養細胞系を樹立する。遺伝子タイピングにより W 染色体と常染色体のみをもつ培養細胞系を同定する。この細胞をもちいて支援班の援助によって BAC ライブラリーを作成する。

ジャワメダカ性決定領域の詳細な連鎖地図作成（新潟大学）

ハブスメダカではかなり詳細な性染色体連鎖地図（Takehana et. al., 2007）が作成されているが、ジャワメダカではいまだ十分に詳しい連鎖地図が作成されていない。そこでメダカ EST マーカーをもちいてジャワメダカ性決定領域の詳細な連鎖地図を作成する。予備的な結果ではインド産とタイ・ペナン島産の集団間では約半数の LG16 上の DNA マーカーが多型を示すことから、現在より更に詳細な地図を作成可能であると考えている。また別の地域から系統を導入することでマップ出来るマーカーの頻度を増やす。

<2008 年度の成果>

ハブスメダカ ZZ 個体からの培養細胞系の樹立と BAC ライブラリーの作成

遺伝子タイピングによって同定したハブスメダカ ZZ 個体（雄）より培養細胞系の樹立をおこなった。L-15 培地 + 15%FBS をもちいて 1 個体より初代培養細胞を作成し、それを継代することで培養細胞系を樹立することができた。75 cm² フラスコで 20 個まで増殖したことから国立遺伝学研究所比較ゲノム解析研究室（支援班）に持参し、アガロースプラグの作成をおこなった。現在は BAC ライブラリーの作成をおこなっている。

ジャワメダカ ZZ 個体からの培養細胞系の樹立と BAC ライブラリーの作成

ジャワメダカにおいてもハブスメダカと同様に遺伝子タイピングによって ZZ 個体の同定をおこない L-15 培地 + 15%FBS をもちいて 1 個体より初代培養細胞を樹立した後、75 cm² フラスコで 40 個まで増殖させた。ハブスメダカと同様に国立遺伝学研究所比較ゲノム解析研究室に持参し、アガロースプラグの作成をおこなった。現在は BAC ライブラリーの作成をおこなっている。

セレベスメダカ培養細胞系の樹立と BAC ライブラリーの作成
東京大学大学院理学系研究科野中教授との共同研究としてセレ

バスメダカをもちいた培養細胞系の樹立をおこなった。遺伝子タイピングによってMHC領域が異型接合を示す個体を同定し、尾鰭より、初代培養細胞を作成した後、75 cm²フラスコ16個まで増殖させた。ハブスメダカ、ジャワメダカと同様に国立遺伝学研究所比較ゲノム解析研究室に持参し、アガロースプラグの作成をおこなった。現在セレバスメダカでもBACライブラリーの作成をおこなっている。

インドメダカ性決定領域の塩基配列決定

2006-2007年度の特定期域研究によって作成したX染色体とY染色体を区別して作成した2種類のBACライブラリーと我々が作成したFosmidライブラリーをもちいてXおよびY染色体それぞれについて性決定領域を完全にカバーするBAC/Fosmidクローンコンティグ(物理地図)を作成することができた。それぞれのクローンよりショットガンライブラリーを作成し、支援班の協力によって、インドメダカ性決定領域の塩基配列を完全に決定することができた。これによってインドメダカY染色体の性決定領域にはX染色体にはない特異的領域が存在することが明らかとなった。しかしその領域には逆転写酵素の一部と見られる塩基配列が反復配列として多く含まれるのみでインドメダカ性決定遺伝子の候補となるような配列を塩基配列のみから絞り込むことはできなかった。そこで現在は性決定領域に由来するBAC/FosmidクローンをXX個体に遺伝子導入することで雄への性転換能を有するクローンの同定を行っている。

ルソンメダカ性決定遺伝子の同定

ルソンメダカXX胚に由来するBACライブラリーからルソンメダカ性決定領域を完全にカバーする4つのBACクローンを同定した。4クローンのショットガンシーケンスをおこない塩基配列を決定した。またYY個体に由来するFosmidライブラリーから相同領域のクローンを同定するため、X染色体に由来するゲノム塩基配列を用いて、約30k bp間隔でPCRプライマーの設計をおこないYY個体に由来するfosmidライブラリーを鋳型にしてPCRをおこなった。その結果すべてのプライマーで予想されるサイズのPCR断片が検出された。その後YY個体由来fosmidライブラリーのスクリーニングをおこない、Y染色体の性決定領域を完全にカバーする物理地図を作成した。物理地図を作成したfosmidクローンからショットガンライブラリーを作成し、支援班の協力によって、すべてのクローンの塩基配列を決定した。XおよびY染色体に由来する塩基配列を比較したところ両者は同じ遺伝子(PG1-9の9遺伝子)を含んでいた。Y染色体に由来するfosmidクローンをもちいて遺伝子導入個体を作成したところOluFY3-1クローンを導入した個体において、遺伝的にはXXにもかかわらず雄の表現型を示す個体を得ることができた。またその子孫でも導入遺伝子を持つ個体は雄の表現型を、持たない個体は雌の表現型を示すことがわかった。ルソンメダカ性決定領域にコードされる9遺伝子(PG1-9)のうち3遺伝子(PG3-5)がOluFY3-1クローンに含まれていた。またPG1からPG9のなかでPG5のみが性分化期に雌雄で発現の違いがみられた(Y染色体に由来するPG5の発現が雄で強い)。これらの結果からPG5はルソンメダカ性決定遺伝子の有力な候補遺伝子であることが示唆された。

<国内外での成果の位置づけ>

これまでの研究によってメダカ、ルソンメダカ、インドメダカ(IMBXとIMBYの2ライブラリー)のBACライブラリーを作成し、スクリーニング用3D PCR スーパープールを作成することができた。また今年度はハブスメダカ、ジャワメダカ、セレバスメダカのBACライブラリー作成を開始した。これらのBACライブラリーが完成すれば、メダカ近縁種の系統解析によって判明

した3つの単系統群(latipes species group, celebensis species group, javanicus species group)のすべで、少なくとも1種についてはBACライブラリーを利用することが可能となる。基軸モデル生物の近縁種リソースの整備ではメダカとその近縁種は、少なくとも脊椎動物でもっとも整備が進んだグループのひとつになったといえる。このリソースをもちいた代表的研究のひとつとして進めてきたメダカ近縁種性決定システムの進化に関する研究に関しても、ルソンメダカ性決定遺伝子の非常に有力な候補遺伝子も見いだしている。またインドメダカにおいても性決定領域の塩基配列をすべて決定することができた。当初計画とは遅れながらも、メダカ近縁種ゲノム基盤の整備は着実に進展してきたといえる。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

今年度に計画していた半数体胚をもちいたW染色体と常染色体をもつ培養細胞系の樹立ができなかった。これは半数体由来の培養細胞の増殖能が2倍体胚に比べ低いためである。さらに多くの個体もちいて培養条件を検討する必要がある。

<今後の課題>

今後の課題として整備したBACライブラリーの3D PCR スクリーニングシステムをどのように他の研究者と共用していくのかという問題がある。利用できるDNAプールの量は限られており、無制限にオリジナルDNAプールを配布することには無理がある。PhiシステムをもちいたDNA増幅はひとつ可能性である。また我々のラボでも分注ロボットをもちいた3D PCR スクリーニングシステム作成系を構築したので、さらに大量のDNAプールを作り、配布するのも方法のひとつである。今後何らかの方法でDNAプールを配布できる体制を構築する必要がある。

ジャワメダカとハブスメダカの性決定遺伝子同定ではかなり大規模な物理地図作成システムを構築する必要がある、なぜならば両種ではすでにZ染色体とW染色体間に形態的分化が生じており、W染色体にはヘテロクロマチンの蓄積がみられるとともに、かなり広い領域で組換えが抑制されている(少なくとも数メガbp)。ヘテロクロマチンを含む領域には反復配列の蓄積が予想されることから単純なBAC末端配列によるwalkingはかなりの困難が予想される。メダカゲノムに情報から当該領域と考えられるBACクローンを網羅的に探索して、fingerprint法によってクローン間の重なりを推定するような方法論とトランスジェニックによって性転換能をもつクローンを同定する方法を併用することが考えられるが現状のトランスジェニック作成はスループットが十分とはいえない。

<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)

- Nagai, T., Takehana, Y., Hamaguchi, S., and Sakaizumi, M. (2008) Identification of the sex-determining locus in the Thai medaka, *Oryzias minutillus*. *Cytogenet. Genome Res.* 121, 137-142. 受付番号 0901121133
- Takehana, Y., Hamaguchi, S., and Sakaizumi, M. (2008) Different origins of ZZ/ZW sex chromosomes in closely related medaka fishes, *Oryzias javanicus* and *O. hubbsi*. *Chromosome. Res.* 16, 801-811. 受付番号 0901121149

現在岡部班員(東京慈恵会医科大学解剖学講座)とポリプテルスゲノム基盤整備に関する共同研究をおこなっている。また神原班員(慶應義塾大学理工学部生命情報学科)とMurasakiシステムをもちいた新骨類汎用プライマーの設計に関する共同研究をおこなっている。