

メダカゲノミクスの進展

成瀬 清

東京大学大学院

本日はメダカの宣伝の場を与えていただき、どうもありがとうございます。

メダカは前世紀の初めごろからずっと実験材料に使われている魚で、特に日本ではメダカという言葉やメダカという魚自身は、一般の人も知らないということはほとんどないというぐらい、有名というか一般的な魚です。しかしそのゲノムの構造やゲノム情報となると、必ずしも十分に知られていません。今回の私の話としては、メダカのゲノム解析がどこまで進んでいるのかという点とそのゲノム解析あるいはゲノム情報という光を脊椎動物で得られた最も古典的なED現象であるメダカの性転換に照らしたとき、それがどのように見えるかという点について話したいと思います。

これはメダカの自然集団の遺伝的な構造を示したものです。メダカは4つの遺伝的に異なる自然集団があります。それぞれ北日本集団、南日本集団、東韓集団、中国-西韓集団と名前が付けられています。この4つの中では北日本集団と南日本集団が最も近縁な関係にあります。けれども、この2つの集団間でゲノムDNAの塩基配列を比べますと、アミノ酸をコードしている領域で約1%、非コード領域で約3%の違いがあります。これはヒトとチンパンジーぐらいかもうすこし大きな違いだと思っていただければいいと思います。さらにもう一つの特徴としては、集団間でこんなにも遺伝的に違うにもかかわらず、その間の交配が完全に自由にできるということです。さらに、この4つの集団からそれぞれ近交系が樹立されており、それによって多くの個体を遺伝的に均一な系として扱うことができます。これがメダカを遺伝学的に扱う場合の、最も大きな有効性あるいは特徴となります。

まずゲノムの特徴を比較してみます。比較する対象ですが、この欄はメダカのデータですが、今現在は、小型魚類の中でゲノム解析がよく進んでいますゼブラフィッシュと、そして我々ヒトを、比較対象にしております。簡単にゲノムの特徴をお話ししますと、ゲノムサイズですが、メダカを1としますと、ゼブラフィッシュは2、そしてヒトはその倍の4という関係になり、染色体の数がメダカ48、ヒトは44+XY、ゼブラフィッシュが50です。性決定システムがメダカとヒトはXX-XYですが、ゼブラフィッシュはわかっていません。たぶん主要な性決定遺伝子はないと考えられます。

このようなゲノムの特徴を持つ3種を比較しております。比較のための初めの実験として私どもがやったことは、メダカの遺伝子のレパートリーを調べる、いわゆるEST解析をやりました。EST解析についてはご存じの方も多いと思いますが、簡単に述べますとcDNAライブラリーを作り、そこからランダムにクローンをピックアップし、普通は5'と3'の両方から塩基配列を決定します。今回、私たちの場合は5'端だけから配列を読んでいます。読んだ配列をブラストというプログラムを使い、既存のデータベースに対してサーチをおこない、決定した塩基配列が既に登録されている他種のDNAデータと相同性があるかどうかをまず確かめます。

同時に、重複して遺伝子が取れてきますので、クラスタルWというプログラムにより重複するクローンを探し、その重複を除き、最終的に重複のないそれぞれ配列が異なったデータセットを作ります。それをデータベースとしてホームページ上で公開するわけです。今、私たちはMベースというデータベースを作っており、このurl (http://mbase.bioweb.ne.jp/~dclust/medaka_top.html) ですべて公開しています。公開しているだけでなく、そのクローンの配布にも応じています。

これが1年ちょっと前のEST解析の結果です。5つのライブラリーから由来する約8000のクローンを読み、そのクラスター解析の結果、約4600のクラスターになる、つまり4600のユニークな遺伝子を一応同定したということになります。ちょっとここは議論があるのですが、おまかにはそのように考えていただければよろしいかと思います。それぞれどんなライブラリーを作成したかと言いますと、OLaという名前を付けたライブラリーは、雄と雌の全身に由来します。あとこの2つはメダカの培養細胞から作っています。あと残りは卵巣(ovary)と肝臓(liver)からそれぞれ作りました。

ブラストサーチをかけますと、この 4600 のクラスターのうち約半分、約 2000 ぐらいの塩基配列が既存のデータベースにある他の種の cDNA の配列と相同性を示します。この 2000 のうちの特にヒトとの相同性が高いものを選び、それがゲノム上のどこにあるかを遺伝子マッピングという手法で解析しました。

これが EST マッピングの方法ですが、まず EST 配列あるいは cDNA の配列に基づきプライマーを合成します。それで先程言いました南日本由来の AA2 という近交系のゲノムと、北日本由来の HNI という近交系のゲノム DNA を鋳型にして PCR を行います。そして、そのあと単一バンドが増幅するプライマーを選び、増えてきた DNA 断片を制限酵素で切り、いわゆる RFLP を探すわけです。その RFLP をマーカーにして、バッククロスのパネルをもちいてそれぞれの個体を遺伝子タイピングして、そのタイピングのパターンから、それぞれのマーカーの連鎖関係を決定いたします。

これが、プライマーのスクリーニングの例ですが、ここに EST 配列の名前があります。それぞれの EST 配列からプライマーを合成します。大体 cDNA 上では 300base pair ぐらい離してプライマーをつくりませんが、イントロンがありますので、それよりも大きいもの、あるいは同じ程度のものといろいろなサイズの DNA 断片が増幅してきます。このように 1 本だけバンドが増えてくるプライマーを選びます。このプライマーでは AA2 と HNI のゲノムで増幅する DNA 断片の長さが違います。これはイントロンサイズに系統間で違いがあると推定されます。増幅するサイズが同じものは 8 種類の制限酵素で切り、RFLP を示すかどうかをチェックします。このプライマーで増幅する DNA 断片ではすべての制限酵素で、切れ方のパターンに差があります。これを見ただけでも、北日本メダカと南日本メダカのゲノム配列がいかに違っているかがわかると思います。

これはこのようにして作った連鎖地図です。先程、メダカの染色体の数が 48 と言いましたが、その半分の数にあたる 24 の連鎖群が得られています。これはそれぞれの連鎖群が一つ一つの染色体にあたるのだと思います。これは少し前のデータですが、この地図上に約 500 の遺伝子がマップされています。この遺伝子地図とヒトの遺伝子地図を比較したのが次の図です。横軸がヒトの 1~22 と XY 染色体、縦軸がメダカの連鎖群です。連鎖群 1 番 (LG1) を例にしますと、このメダカ LG1 にある遺伝子が、ヒトの何番の染色体に乗っているかを調べるわけです。そして点を 1 個ずつ打っていきます。そうしますと、このようにドットが固まっている領域が見えてきます。

これはメダカとヒトで、複数の相同な遺伝子が同じ連鎖群あるいは同じ染色体上に乗っていることを示します。こういう状態を「シンテニー (synteny) が保存されている」と我々は言っているのですが、そういう領域がいくつか見えてきます。理由はまだはっきりしないのですが、Hox という遺伝子が乗っている連鎖群ではシンテニーが保存されている様子がよく分かります。

先程のものは 377 の遺伝子を相互に比較した例なのですが、それを特定の連鎖群でもう少し詳しく見てみます。これは RS3 というミュータントのポジショナル・クローニングの過程で出てきた結果です。RS3 というのは、鱗 (うろこ) がいないメダカの突然変異体です。これをマップしますと、LG21 にある Hoxd 遺伝子と連鎖していることが分かりました。その Hoxd という遺伝子は、ヒトで言いますと染色体 2q に乗っております。たまたまこの領域には、EST 解析をしているときに取れていた nebulin という遺伝子がのっていましたので、その nebulin をマップしてみました。すると同じようにメダカの LG21 に乗ったわけです。

そのことから、ひょっとしたらメダカの LG21 とヒトの 2q というのは、すごく遺伝子が保存されているのではないかと、つまりシンテニーが保存されているのではないかと考え、ヒトの 2q の上に乗っている遺伝子を片っ端から取ってメダカでマッピングをしてみました。そうしますと、もちろん違う連鎖群に行ってしまうものもあるのですが、かなりの部分が LG21 と LG2 に乗ることが分かりました。これらの遺伝子が、ゼブラフィッシュではどこに乗っているかという、ゼブラフィッシュの LG9 に乗っています。つまりこの間で、シンテニーはかなり保存されているということです。

最終的にわかったことは、RS3 という鱗がないミュータントの原因遺伝子が、EDAR、これは TNF receptor super gene family の一員なのですが、それに突然変異が入っていることが分かりました。つまり、原因遺伝子がわかったということです。この EDAR 遺伝子は、マウスやヒトでも突然変異体が知られております。この場合はどういう表現型かという、毛がないという表現型を示します。

つまり、同じ遺伝子の突然変異が、ヒトあるいはマウスでは毛がない、メダカでは鱗がないことになります。このことから、メダカあるいは魚は、ヒトの親戚なのだということがわかっていただけないのではないかと思います。

います。ただ、もう少し言うと、遺伝子の順番というのは非常にぐちゃぐちゃで、ある意味で全然保存されていません。このことは逆位は非常に頻繁に起こりますが、それに比べたら転座はそうでもないということであると思います。いろいろ見てきますと、もちろん異なっている部分も多いのですがヒトとメダカは結構似ているのではないかというように思われるわけです。

これが今の、メダカゲノム解析の現状なのですが、こういうゲノム解析でえられた情報を、今度は非常に古典的なメダカの性転換という現象に当てはめてみます。メダカの人為的性転換は1953年に山本時男先生によって発表された研究なのですが、昨日も出ました d+r という系統を使っています。この実験ではまず雄が赤、雌が白になる、つまり Y 染色体の上に赤を決める遺伝子が乗っているような系統を作ります。その系統に普通の餌を食べさせると、雄と雌がそれぞれ 1 対 1 で出て、それぞれオスが赤でメスが白となります。

この系統の魚にエストロンの入った餌を食べさせます。すると赤と白という意味ではほぼ 1 対 1 に出るのですが、赤い雌が出てくる。つまり遺伝的には XY、つまり雄になるはずのものなのに、エストロンの入った餌を食べることで完全な雌になってしまうという、ある意味で典型的な内分泌攪乱現象だと思うのですが、この様な現象が発見されました。この現象の発見には、今から考えますいろいろな意味でラッキーな部分がありました。それを示したのがこれです。このスライドは系統による性転換効率の違いを示しています。先程 d+r の系統の話をしていましたが、ここは d+r という系統から樹立した近交系 Hd-rR の性転換効率です。ここは HNI という北日本メダカ由来の近交系の性転換効率です。性転換効率の測定方法は卵を 0.25 μ g/ml の E2 が入った水の中に漬けておきます。成熟まで飼育しますと Hd-rR の系統では先程の山本先生の研究と全く同じように、約 90% の個体が、性転換し、雌に変わります。それに比べますと、HNI の系統では同じ濃度で同じように処理しても、ほとんど性は変わりません。性転換率は 5% ぐらいになります。

したがって今言えることは、山本先生がもし北日本メダカを使っていたら、あの性転換の実験はうまくいっていないということです。では処理する E2 の濃度を上げてやろうということになりますが、その場合は濃度を上げてしまうと両方とも胚が死んでしまい性転換個体は得られません。

ではこの現象をになっている、つまりこの差を作っている遺伝子がどこにあるかということですが、この解析にはコンジェニック系統を作って解析をしています。コンジェニック系統と言うのは Hd-rR のバックグラウンドに HNI など他系統の Y 染色体だけを持った系統です。黒い部分が、HNI 由来の Y 染色体ですが、この系統は Y 染色体全体が HNI 由来なのです。次の系統はさらに Y 染色体の一部だけが HNI 由来します。この系統はさらに少ない領域だけが HNI の Y 染色体に由来します。実はこの領域にはメダカの雄性決定遺伝子が乗っています。

このグリーンは、先程言いました東韓集団、東韓国の集団に由来する Y 染色体を持ったコンジェニック系統の性染色体地図です。これは中国-西韓集団からの Y 染色体を持ったコンジェニック系統の性染色体地図です。コンジェニック系統の作成には 10 代程度の戻し交配が必要です。1 世代が約 3 か月ですから、系統を作るだけかなり大変な仕事です。

これらのコンジェニック系統を使い、それぞれの系統で性転換効率がどう異なるかを調べるわけです。これは先程と同じスライドですが、このピンクのバーが Hd-rR の性転換効率です。黒いバーが HNI の性転換効率です。この白いバーは、ほとんどの遺伝子が Hd-rR 由来なのですが、Y 染色体のほんの一部分だけが HNI に由来するという系統の性転換効率です。ピンクと白のバーを比べますと E2 による性転換効率が大きく異なります。一方で東韓国の集団と中国-西韓集団の Y 染色体を持っても、性転換はかなりの頻度で起こるが、Hd-rR とはその効率が少し異なります。

もうすこしメダカ性染色体地図を詳しくみてみます。この白いバーの系統が、HNI とほぼ同じエストロゲン感受性を持つということは、HNI 系統の Y 染色体に由来するこの領域がエストロゲンの感受性を支配しているということです。エストロゲンの感受性をコントロールしているのは、普通は ER (エストロゲン・レセプター) だろうということになるわけですが、現在メダカでは ER はアルファ、ベータ、ガンマと 3 つが知られています。今のところデータのあるのは ER アルファとガンマなのですが、アルファとガンマはこの領域にはありません。ベータに関してはまだわからないのですが、この領域では、性決定遺伝子のポジショナル・クローニングを、長濱先生と酒泉先生のグループがやっておられまして、ほぼ完全に塩基配列決定が終わっています。つまり、このあたりのゲノム解析はほぼ終わっているわけです。

このあたりのゲノムの配列をしらべていますが、そこにはER様の遺伝子は今のところ見つかっていません。結論といたしまして、ERがこのエストロゲンの感受性に関係していることはないということです。そのように一応考えられます。では何がこれを支配しているのだろう。まだ十分なデータはありませんが、たぶんこれは性決定遺伝子そのものの多型がこの感受性を決定しているのではないかと考えられており、現在その実験がなされています。

少し早めですが、コラボレーターあるいはコントリビューターは言うなということなので、私の話はこの辺で終わらせていただきます。最後ですが、3枚目のスライドで出したヒトとゼブラフィッシュとそしてトラフグは、シーケンスレベルのゲノム解析がおこなわれている種です。私たちがぜひメダカをもちいてシーケンスレベルのゲノム解析をやりたいと思っております。しかし、思っただけではシーケンスレベルのゲノム解析には相当のお金がかかりますし、一方で現在の研究全般のスピードを考えますとゲノムシーケンス自身にはあまり時間がかけられません。日本独自のゲノム情報の発信と言う意味でもメダカゲノムシーケンスについて精神的あるいは金銭的サポートをお願いして私のお話を終わりたいと思います。それでは、どうもありがとうございました。