

メダカ染色体 LG22 の解読

○佐々木 貴史¹、清水 厚志¹、石川サビヌ和子¹、今井周一郎^{1,2}、浅川 修一¹、村山 裕治¹、H., Himmelbauer³、三谷 啓志⁴、古谷-清木 誠⁵、近藤 寿人⁵、I., Nanda⁶、M., Schmid⁶、M., Schartl⁶、野中 勝⁷、武田洋幸⁷、堀 寛²、嶋 昭紘⁴、清水信義¹

1) 慶應大・医・分子生物 2) 名大・院・生命理学 3) Max-Planck-Institute of Molecular Genetics, Berlin, Germany 4) 東大・新領域・先端生命 5) 近藤誘導分化プロジェクト・SORST 6) Dept. Physiol. Chem. I, Univ. Wurzburg., Germany 7) 東大・院・理

メダカ(*Oryzias latipes*)はゲノムサイズが比較的小さいこと (800Mb)、世代周期が短いこと、多くの純系種が単離されていること、自然突然変異株が利用可能なことなどの利点から近年注目されている。また、ラ-ジスケール突然変異スクリーニングなどにより変異体が入手しやすいこと及びモルフォリノアンチセンスオリゴなどによる遺伝子の機能解析に用いるモデル生物としても今後大いに期待されている。

そこで我々は、メダカの染色体で予想されるゲノムサイズとマップされた EST マーカーの数からマーカー密度が最も高いと推定される染色体 LG22 の解読を目標としゲノム DNA シーケンシングを行っている。現在までに、22Mb の BAC コンティグを作製し、20Mb のシーケンシングが終了している。

17Mb の LG22 ゲノム DNA 配列を用いた解析により、ヒトにオルソログが存在する 547 遺伝子と、ヒトにオルソログが存在しない 17 の予測遺伝子を同定した。この遺伝子数からメダカゲノム全体の遺伝子は約 26,000 と算定された。GC 含量の平均は 40.9%であり、フグよりも低く、ヒト及びマウスと同程度であった。また、哺乳類のプロモーター領域に見られる明らかな CpG アイランドは存在しなかった。一方、既にシーケンシングされている 2 種のフグとの比較解析により、メダカ-フグ間にはシンテニーが非常に保たれており、特にメダカ LG22 の 13Mb 領域は、テトラオドン 10 番染色体に相当していることが明らかとなった。

魚類体節の分節化機構の解明

荒木和男（水産総合研究センター養殖研究所生産技術部育種研究グループ）

魚類は最も種類の多い脊椎動物であり、様々な形態を持つ種が存在する。この内、体の長さや大きさは、器官形成期の初期胚で作られる体節の数と大きさによって規定される。体節は、尾部末端に存在する幹細胞が中胚葉細胞に分化して作られるブロック単位の組織であり、胴尾部オルガナイザーの活性が無くなるまで新しい体節が作り続けられる。我々は、種による体節の数の違いがどのような機構によってもたらされるかに興味を持っている。そこで、まず、尾部末端の胴尾部オルガナイザー領域で発現する *T-box* 遺伝子と *forkhead* 遺伝子を網羅的に単離し、機能の解析を進めた。その結果、胴尾部の未分節中胚葉領域で発現する新規の *T-box* 遺伝子である *tbx24* 遺伝子を単離した。その機能抑制実験と体節の分節化が起こらないゼブラフィッシュの突然変異体 *fss* の連鎖解析から、*tbx24* 遺伝子が *fss* の変異を起こした遺伝子そのものであることを明らかにした。

尾部領域の比較的広い領域で発現する *tbx24* がどのような機構で分節化を誘導するかは極めて興味を持たれるところである。そこで、まず、どのような機構で *tbx24* 遺伝子の発現が制御されるかを解析することにした。胴尾部オルガナイザー領域では *fgf8* 遺伝子が発現していることから、*fgf8* による *tbx24* の発現誘導の可能性を見るために *fgf8* を浸透させたビーズの移植と *fgf8* の発現抑制剤として働く SU5402 による処理の影響を調べた。その結果、*tbx24* は FGF8 ビーズによって発現誘導されること、SU5402 によって発現抑制されること、*fgf8* の突然変異体 *ace* では 8 体節以後極めて発現が弱くなることから *tbx24* は *fgf8* によって発現誘導されることが考えられた。

fss のこれまでの研究から、*fss* 突然変異体では体節の分節化において重要な働きをする *mespa* や *her1* の発現が抑制されていることから、少なくともこの 2 つの遺伝子は *tbx24* によって発現誘導されることが分かっている。さらに、どのようなカスケードの遺伝子が *tbx24* によって制御されて、分節化が誘導されるか極めて興味を持たれるところである。そこで、体節形成期の初期胚で発現する蛋白質を二次元電気泳動で調べた結果、*fss* で発現抑制がかかっている蛋白質が存在することが明らかになった。そこで、ゲル内の蛋白質を分解酵素処理した後、ESI 型質量分析計を用いたアミノ酸配列の解析を行い、その情報をもとに PCR により遺伝子の増幅を行い、現在、発現の解析を行っているところである。その内の 1 つは IL4 であった。これらの結果について報告する。

イルカの Hox 遺伝子クラスター領域の解析

○今井周一郎^{1,2}, 石井靖幸^{2,3}, 佐々木貴史², 清水厚志², 石川サビヌ和子², 吉岡 基⁴, 浅川修一², 清水信義²

1) 名大院・理・生命理学 2) 慶應大・医・分子生物 3) CREST JST 4) 三重大・生物資源・生物圏生命科学

イルカは陸上動物をその祖先とするにも関わらず、水中に移り住むことにより魚類に極めて似通った形態に収斂進化している。また、水中移動や聴覚、睡眠に関して注目すべき能力を有し、生理学的、行動学的にも、特異な形質を進化させている。これらの興味深い特徴はゲノム解析の格好のモデルとなるにもかかわらず、イルカの本格的なゲノム解析は未だ報告されていない。我々は、イルカの形態形成の進化における分子メカニズムを解明するためにゲノム解析をスタートした。

まず、イルカの特長的な形態を形成する遺伝的基盤の候補として、Hox 遺伝子クラスターを選択した。Hox 遺伝子は転写因子をコードしており、多細胞動物の発生分化過程において形態形成の中心的役割を担っていることが知られている。哺乳類では 39 個の Hox 遺伝子が A-D の 4 クラスターに別れて存在している。クラスター内のそれぞれの Hox 遺伝子はゲノム上の並びに従って頭部から尾部への体軸に沿って発現し、それぞれが部位特異的な形態形成に関与していることが明らかになっている。例えば、HoxD クラスターのいくつかの遺伝子は脊椎動物において手足の末端や尾部の形成に関与しており、ヒトでこの遺伝子に変異があると手足に先天性の異常が生じる。イルカには足に相当する器官が存在しないことから、HoxD クラスターを陸上脊椎動物と比べることで、イルカの四肢の発生基盤が解明できる可能性がある。そこで、イルカの形態形成に関する遺伝子レベルの新しい知見を得ることを目的とし、イルカ Hox クラスターのゲノム DNA 配列の決定を行っている。

イルカのゲノム DNA リソースとして、バンドウイルカ(*Tursiops truncatus*) ゲノムの 4 倍をカバーする BAC ライブラリーを構築した。Hox クラスター領域を含む BAC DNA をスクリーニングするために、各クラスターに一つずつ、計 4 つのプローブをヒトの HOX 遺伝子の配列から作成し、スクリーニングを行った。その結果、A-D のそれぞれのクラスターを含む BAC DNA をスクリーニングできた。現在、ショットガン法により、BAC DNA の塩基配列決定を行っており、Hox クラスター領域の約半分のゲノム DNA の配列を決定し解析を進めている。

魚類ミオシン重鎖の分子進化と機能分化

○渡部終五・池田大介・梁春実・小野陽介・陶妍

東京大学大学院農学生命科学研究科

ミオシンは筋肉中で最も大きな割合で含まれるタンパク質で、筋運動に重要な役割を果たす。ヒトを含む哺乳類では、速筋を構成するミオシンは6種類存在し、各アイソフォームは発生段階および筋繊維の種類によって発現が変化する。ミオシンは約200 kの重鎖2本と約20 kの軽鎖4本からなるが、上述したアイソフォームは重鎖サブユニットを基本としたものである。演者らはこれまで、魚類においてもミオシン重鎖アイソフォームが存在し、その発現は発生段階や環境水温により変化するを明らかにしてきた。しかしながら、魚類の研究ではほとんどが mRNA およびタンパク質レベルのもので、すべてのアイソフォームを網羅しているとは言い難い。そこで今回、ゲノムレベルからの探索を含めて速筋型ミオシン重鎖アイソフォームを詳細に解析し、魚類ミオシン重鎖の分子進化と機能分化を考察した。

ゲノムのドラフト配列が公開されているトラフグのデータベースを利用し、速筋型ミオシン重鎖遺伝子を探索したところ、ゲノム中の5つの領域に当該遺伝子がみつき、そのうち3領域ではクラスターを形成することが明らかとなった。また、RT-PCR による発現解析により、これら遺伝子は組織特異的な発現パターンを示すだけでなく、発生段階に依存して発現するアイソフォームもみつかった。また、本研究でクローニングされたトラフグの速筋型ミオシン重鎖と、既報の魚類のデータを用いて分子系統樹を作成したところ、種間にまたがり存在するオーソログ遺伝子は必ずしも同じ発生段階に発現するとは限らないことが明らかとなった。すなわち、トラフグ、メダカ、コイでは発生初期に発現するミオシン重鎖アイソフォームは、シログチおよびスケトウダラ成体速筋のほか、10°C 飼育ソウギョの速筋で主成分として発現するものと同じグループに属した。また、このグループには無顎類のカワヤツメからクローニングされたミオシン重鎖も含まれることから、当該分子は四足類と硬骨魚類の共通祖先が分岐する以前から存在する古いタイプのアイソフォームであることが示唆された。

トラフグ BAC およびコスミド配列データを利用したミオシン重鎖遺伝子の解析

○池田大介・渡部終五

東京大学大学院農学生命科学研究科

哺乳類では6種類の速筋型および2種類の心筋型ミオシン重鎖遺伝子がそれぞれゲノム上の1箇所ではタンデムクラスターを形成し、クラスター内の配列が遺伝子の時空間的な発現変動に関係することが示唆されている。しかしながら、魚類ミオシン重鎖遺伝子ではゲノム上の存在形態や正確な遺伝子数など、不明の点が多く残されている。そこで、ドラフト配列が公開されているトラフグ *Takifugu rubripes* のゲノムデータベースを利用し、ミオシン重鎖遺伝子の探索を行った。

本研究により、トラフグには少なくとも9種類の速筋型ミオシン重鎖遺伝子が4箇所以上の領域に分散していることが示された。また、心筋型は5種類以上存在し、少なくとも1箇所ではクラスターを形成することが明らかとなった。しかしながら、トラフグ・ゲノムデータベースはドラフト配列から構築されており、構成している各 scaffold の5' および3' 両端にはミオシン重鎖およびその関連遺伝子が完結している例は少なかった。そこで、英国 RFCGR が別途公開しているトラフグ BAC およびコスミド・ライブラリーの末端配列および内部配列データベースを利用し、ミオシン重鎖遺伝子を含む各 scaffold の相対的な位置関係を解析した。その結果、トラフグ速筋型ミオシン重鎖遺伝子は5つの領域に存在し、そのうち3領域でクラスターを形成することが明らかとなった。また、心筋型は2領域に存在し、そのうちの1つでクラスターを形成していることが示された。また、ミオシン重鎖遺伝子クラスターを含む BAC およびコスミドクローンを使用して、クラスター内に存在する当該遺伝子数を正確に計測することができた。

以上の結果より、トラフグ・ゲノムのドラフト配列からなるデータベースと BAC およびコスミド配列データベースを組み合わせることで遺伝子の解析が効率よく行えることが明らかになった。

培養細胞を用いたメダカ温度適応関連遺伝子の網羅的解析

○平山真・中庭真基子（東大院農）・三谷啓志（東大院創域）・渡部終五（東大院農）

広温域性淡水魚のメダカは、季節的に大きく変化する環境水温に対しても代謝の恒常性を維持し、生存することが可能である。しかしながら、これらの機構を制御する遺伝子カスケードは未だ同定されていない。メダカは日本国内外に明確な地域集団が存在し、集団間の遺伝的変異が大きい。また、各集団由来の近交系が確立されており、EST 解析や全ゲノム解析による遺伝情報の蓄積も著しい。本研究ではこのようなメダカのゲノム情報や遺伝的特性を生かし、環境水温の変化に伴って発現変動する遺伝子を網羅的に探索することを目的とした。

線維芽細胞様の培養細胞を用いて温度適応関連遺伝子の探索を行った。北日本集団メダカ由来細胞 3 株、南日本集団由来細胞 4 株、東韓集団由来細胞 1 株、さらに対照として東南アジアに生息するセレベスメダカ由来細胞 1 株につき、33℃で継代後、15、10 または 4℃へ移行し、増殖曲線を調べた。また、温度依存的な発現変動が示唆されている既報の 67 遺伝子の配列をメダカ EST データベースから抽出し、15℃で 7 日間培養した北日本集団由来細胞 OLHNI-1 を対象に RT-PCR に供して、33℃で同日数培養したものと遺伝子発現を比較した。さらに RT-PCR により温度依存的な発現が示唆された 2 遺伝子につき、各集団由来細胞 1 株ずつ計 3 株を 15℃で 7 日間培養して real-time PCR に供し、33℃で同日数培養したものと比較した。

33℃で培養した細胞株を 10℃および 4℃へ温度移行したところ、各細胞株で増殖の停止または細胞数の減少がみられ、とくに対照のセレベスメダカ由来細胞 CE-1 では 4℃へ移行後に著しい減少がみられた。一方、15℃へ移行後 11 日目では、北日本および東韓集団由来各細胞は増殖傾向にあり、逆に、南日本集団由来各細胞および CE-1 では減少傾向にあった。北日本集団由来細胞 OLHNI-1 を対象に行った RT-PCR の結果、*HSP47* が 33℃で、*I β B β* および *Rab-1c* を含む 7 遺伝子の発現量が 25℃で高くなることが示唆された。また、real-time PCR の結果、*I β B β* および *Rab-1c* はいずれも北日本および東韓集団由来細胞株で 33℃に比べて 15℃で発現量が有意に大きかった。

現在、上記実験に加えて、メダカ EST ライブラリーを用いて cDNA マイクロアレイを作製し、メダカ培養細胞における温度変化に伴う経時的な遺伝子発現プロファイルの作成を試みている。

ゼブラフィッシュの発生過程における HSP70 の役割

山下倫明（水産総合研究センター）

魚類胚は熱、放射線、紫外線、薬剤などのストレスに対する感受性が非常に高いことから、生体へのストレスの影響のメカニズムを解析する上で、重要なモデルとなる。本研究は、魚類胚を研究材料として用いて、*in vivo* でのストレス応答およびアポトーシスの生物学的意義を明らかにすることを目指した。

ストレス誘導性の HSP70 と構成的発現性の HSC70 は、細胞質に主として分布し、ストレス応答時に核に輸送される。真核細胞の HSP70 は共通して、分子の前半部分は ATPase としての活性部位に相当し、後半部分にペプチド鎖に対する結合部位がある。C 末端に Glu-Glu-Val-Asp 配列をもつが、この配列の生理的役割は不明である。HSP70 と HSC70 では、遺伝子構造とその発現には大きな違いが見られるが、分子構造上および細胞機能的な差は認められない。疎水性アミノ酸が連なるペプチド鎖に対して親和性が比較的強い。タンパク質の内部構造は疎水結合によって緻密であり、表面に親水基が露出する構造をとるが、合成途上にあるポリペプチドやストレス条件下での変性によってランダムコイル状になったタンパク質では、疎水基が遊離した状態となるので、HSP70 の標的となりやすい。ATP が存在する環境下で ADP への加水分解のエネルギーを利用して、HSP70 は結合していたポリペプチドを放出して、①合成途上のタンパク質を正しいフォールディングに導く、②小胞体、ミトコンドリアなどへの膜透過が可能な状態を保つ、③立体構造の再生を促進する、④ストレス下での異常タンパク質の再フォールディングを促進し、凝集を防止する、⑤細胞内分解系へ導く、⑥他のタンパク質との相互作用を介助する、という分子シャペロン機能が提案されている。

ゼブラフィッシュを研究材料として、ストレス応答とアポトーシスに関連する遺伝子機能を解析するため、HSP70 遺伝子発現系を導入したトランスジェニックゼブラフィッシュを作出し、それらのストレスに対する応答を調べた。

HSP70 を過剰に発現させたゼブラフィッシュでは発生過程で著しいアポトーシスが誘導されることがわかった。HSP70 によるアポトーシス誘導機構を明らかにするため、ストレス誘導性 HSP70 遺伝子および構成的 HSC70 遺伝子の発現を、モルフォリノアンチセンスオリゴを胚に注入して特異的に抑制すると、HSP70 過剰発現によって生じるアポトーシスは抑制された。このような HSP70 遺伝子導入系および抑制系について、種々の発生マーカーの発現応答を調べたところ、BMP4 が連動することが明らかとなり、HSP70 が BMP4 シグナルを活性化した結果、アポトーシスが生じる分子機構が推定された。

さらに、HSP70 の C 末端部を欠失した変異分子を胚に発現させた場合ではアポトーシスは誘導されなかった。このことから、HSP70 の核移行および基質分子に会合してシャペロン機能に関与する HSP70 分子の C 末端領域がアポトーシスのシグナル活性化に関与することが明らかとなった。

BMP4 の発現誘導には TGF β ファミリーレセプターが Smad 転写因子をリン酸化し活性化する経路が知られている。これらのことから、魚類胚において HSP70/HSC70 は、TGF β ファミリーレセプター（アクチビン様レセプター）のシグナル伝達過程に関与し、Smad2 の活性化を促進するシャペロン分子として作用する分子メカニズムが考えられた。

魚類のサイトカイン遺伝子

酒井正博

宮崎大学農学部

サイトカインは、分子量がおおむね 1 万～数万程度のタンパク質で、免疫反応における細胞間相互作用をつかさどる種々の体液性因子の総称で、現在までに 100 種以上が知られている。2000 年までに、発見された魚類のサイトカインは、インターロイキン(IL) 1 β 、CC および CXC ケモカイン、腫瘍壊死因子 (TNF- α) のみであったが、最近公開されたフグ（トラフグとミドリフグ）およびゼブラフィッシュのゲノムプロジェクトのデータの解析から、多くのサイトカインの存在が報告されている。現在までにその存在が報告されているサイトカインとして、IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-20, IL-21, IL-22, IL-24, IL-26, 多くの CC および CXC ケモカイン、インターフェロン(IFN)- α/β タイプ、IFN- γ （ほ乳類と違って 2 種類）、TNF α と β （?）、トランスフォーミング増殖因子 (TGF- β) 等である。一方、現在まだその存在が確認されていないサイトカインとして、IL-3, IL-4, IL-5, IL-7, IL-9, IL-13, IL-14 等である。そのうち、ほ乳類では、IL-3, IL-4, IL-5, IL-9, IL-13 および顆粒球マクロファージ・コロニー刺激因子 (GM-CSF) は、共に同一染色体上に存在することが知られている。

このように、魚類でもほ乳類とほぼ同等のサイトカインの存在は確認されているが、その機能についての研究は遅れている。その原因として、新しく見つかったサイトカインの多くはゼブラフィッシュからであり、これらのサイトカインの機能を解析するためには個体が小さすぎ、リンパ球や食細胞を用いた研究が困難であるからである。今後、比較的遺伝子の構造が類似しているコイでこれらのサイトカインの遺伝子をクローニングし、その機能を解析する必要がある。

精巣から卵は作れるか？

吉崎悟朗（海洋大・さきがけ）・奥津智之・竹内俊郎（海洋大）

本研究室では、ドナー個体から単離した始原生殖細胞を、免疫系が未熟な孵化直後の稚魚の腹腔内に移植すると、宿主が異種であっても拒絶反応を起こすことなく生着し、自発的に宿主生殖腺に向かって移動すること、さらに、移植細胞は生殖腺内に取り込まれ、増殖した後、機能的な配偶子にまで分化することを明らかにしている。これら一連の技術はマグロのように親魚が大型で飼育が困難な魚種の配偶子を、アジのように小型で飼育が容易な種に生産させる代理親養殖への応用や、始原生殖細胞の凍結保存による魚類の遺伝子資源の保全に有用であると考えられる。しかし、魚類の始原生殖細胞はその数が非常に少なく（ニジマス孵化稚魚では約 50 細胞）、採取可能な発生段階も限られている。そこで本研究では、高等動物では幹細胞が含まれていることが知られている精原細胞に着目し、本細胞の移植によるドナー由来次世代個体の生産技法の開発を目的とした。

ドナーには 9～21 ヶ月令の *vasa-GFP* 遺伝子を導入した優性アルビノニジマスを用いた。これらの供試魚から精巣を単離し、トリプシン処理により細胞を解離した。得られた細胞懸濁液（含 15000 細胞）を野生型ニジマスの孵化稚魚の腹腔内へ移植した。移植後、経時的に宿主を開腹し、蛍光観察を行うとともに、宿主生殖腺は GFP 抗体を用いた免疫組織化学解析に供することで、ドナー由来細胞の挙動を追跡した。満 2 歳に達した宿主個体からは、卵および精子を採取し、通常の野生型ニジマスから得られた配偶子に対して人工授精を行った。得られた次世代の中から、アルビノ個体あるいは *vasa-GFP* 遺伝子導入個体を検出することで、移植細胞の生殖系列伝達効率を産出した。

宿主個体に移植した GFP 標識細胞は、そのうち平均 4.6 個が宿主生殖腺に取り込まれ、そこで増殖、分化を開始した。移植 7 ヶ月後の宿主精巣ではドナー由来精原細胞の巨大なコロニーが観察された。これらの個体は正常に成熟し、移植操作を施した宿主の約半数がドナー由来の精子を含む精液を産出した。また、次世代個体の平均 5.9% がドナー由来のハプロタイプを有していた。驚くべきことに、雌宿主に移植した細胞も宿主卵巣内で正常に発生を開始し、移植 7 ヶ月後には卵母細胞にまで分化している様子が観察された。続いて、40 尾の成熟雌宿主を交配実験に供した結果、16 尾由来の卵から生じた次世代個体がドナー由来のハプロタイプを有していた。

以上の結果から、成魚の精巣に含まれている生殖細胞が性的に未分化な未熟生殖腺にコロナイズできる能力を有していることが明らかとなった。さらに、得られたドナー由来の精子数から計算すると、移植された細胞は百万～数億倍に増殖していることが明らかとなった。このことは、ドナー細胞中に分化能と自己複製能の両者を有する幹細胞が含まれていることを示唆している。さらに、これらの成魚精巣中の生殖細胞（精原細胞と思われる）は性的可塑性を有しており、機能的な卵にも分化できることが明らかとなった。本研究で開発した精巣細胞の移植技法は、細胞の大量供給が容易であるため、代理親養殖や魚類遺伝子資源の保全のための極めて有用なツールになると予想される。

魚肉軟化に関わる鍵タンパク質の特定と 遺伝子組換えによる養殖魚の肉質改善の試み

豊原治彦・高木雅也・木下政人（京大院農）・東畑 顕・山下倫明（中央水研）・久保田 賢
（高知大院黒潮圏）・廣野育生・青木 宙（海洋大）・家戸敬太郎（近大水研）

魚肉は死後、筋肉の軟化が速やかに進行するために鮮度管理がきわめて重要である。このような魚肉の軟化は、筋肉の自己消化によると漠然と理解されてきたが、その生化学的な機構は不明なままであった。そこで、本研究においては魚肉の自己消化の分子機構を解明し、その抑制に関わる鍵タンパク質を特定すること、及びその知見をもとに遺伝子組換え技術を用いた養殖魚の肉質の改善を試みた。

実験魚としてはヒラメ、マダイ、メダカを用いた。遺伝子クローニングはおもに PCR-RACE 法によった。組換えタンパク質の生産は昆虫細胞あるいは大腸菌を用いて行った。トランスジェニック魚の作出は受精卵へのマイクロインジェクションによった。光学顕微鏡、電子顕微鏡による微細構造観察、*in situ* ハイブリダイゼーション、免疫組織学的観察は常法によった。

種々のプロテアーゼ阻害剤が魚肉の軟化に及ぼす影響を検討した結果、魚肉軟化は MMP (Matrix metalloproteinase) によるコラーゲンの分解によること、及び MMP 活性はその内因性阻害タンパク質 TIMP (Tissue inhibitor of metalloproteinase) により制御されていることが明らかとなった。そこで次に TIMP 遺伝子を導入したトランスジェニック魚を作出し、コラーゲンの分解を抑制することにより、養殖魚の肉質改善を試みた。

まず、筋肉アクチン遺伝子のプロモーターを用いて、ヒラメ TIMP 遺伝子を筋肉特異的に発現するトランスジェニックメダカの系統を作出し、この系統のメダカにおけるヒラメ TIMP 遺伝子の発現を調べたところ、ヒラメ TIMP の mRNA は筋細胞に発現されていた。さらに免疫組織学的な検討から、同遺伝子はタンパク質レベルにおいても筋繊維でその発現が確認された。トランスジェニックメダカから切り出した筋肉を 4°C で 24 時間冷蔵し、同様に冷蔵した非導入魚の筋肉と微細構造の変化を比較した結果、非導入魚の筋肉では冷蔵後に筋細胞の分離が観察されたのに対し、トランスジェニック魚の筋肉では冷蔵による影響は認められなかった。以上の結果は、過剰発現させたヒラメ TIMP がメダカの内因性 MMP 活性を阻害したことにより、冷蔵中の筋内膜コラーゲンの分解が抑制された可能性を示唆するものであった。この結果を受け、重要養殖魚であるマダイにこの技術を適用し、現在、その肉質改善を試みている。

耐病性トランスジェニック魚の作出

○矢澤良輔・廣野育生・青木宙（東京海洋大学）

魚類の細菌感染症は養殖業において深刻な問題となっており、安定した生産量を確保するために耐病性魚の作出が望まれている。トランスジェニック技術を用いることで、従来の選抜育種と比較して迅速かつ確実に耐病性系統を作出することが可能である。本研究では、耐病性トランスジェニックヒラメ作出のための基礎的な技術の確立を試みた。

ヒラメ受精卵への遺伝子導入法の確立のため、操作が簡便で、一度に多量の卵の処理が可能であるパーティクルガン法を用いたヒラメ受精卵への遺伝子導入法の検討を行った。パーティクルガン法により緑色蛍光タンパク質（GFP）遺伝子を導入したヒラメ胚では強い GFP 発現が発生の各段階において観察された。GFP 発現を指標に外来遺伝子導入個体の選抜、育成を行うことで効率良くトランスジェニック系統の確立が可能であると考えられた。

次いで、外来遺伝子発現の制御のために、ヒラメ由来組織特異的および誘導型プロモーターの開発を試みた。組織特異性あるいは誘導性発現様式を示す、gelatinaseB、補体 C3、腫瘍壊死因子 TNF および keratin 遺伝子の 5' 上流プロモーター領域を単離した。次いで、それぞれのプロモーター領域に GFP 遺伝子を連結した組換えプラスミドをゼブラフィッシュ受精卵に導入し、トランスジェニックゼブラフィッシュ胚でのプロモーター活性を観察した。4 種類のヒラメ由来のプロモーターは、ヒラメにおける発現パターンと一致しないものがあったものの、トランスジェニックゼブラフィッシュ生体内でそれぞれ異なった活性を示し、ヒラメ由来の転写調節領域に対しゼブラフィッシュの転写調節機構が働いたものと考えられた。このような組織特異性、誘導性を有するプロモーターは様々な目的に応じたトランスジェニック魚作出に際し有用である。

最後に、表皮での発現を制御するヒラメ由来ケラチン遺伝子プロモーターの制御下で、ニワトリ由来リゾチーム遺伝子および GFP 遺伝子を発現するトランスジェニックゼブラフィッシュ系統を作出した。このトランスジェニック系統の細菌感染に対する抵抗性を調べるために *Edwardsiella tarda* および *Flavobacterium columnare* を用いて感染実験を行った。*E. tarda* を感染した野生型ゼブラフィッシュでは 100%死亡したのに対し、トランスジェニック系統では 60%が生存した。また、*F. columnare* を感染した野生型では 100%死亡したのに対し、トランスジェニック系統では 55%が生存した。

本研究において、トランスジェニックヒラメ作出のための、外来遺伝子導入法、プロモーターの開発および耐病性トランスジェニック系統作出用の組換えプラスミドの構築を行った。これらの技術の集積により耐病性トランスジェニックヒラメ作出が可能になると考えられる。

DETAILED GENETIC MAP OF THE JAPANESE FLOUNDER

Cecilia Castaño Sánchez¹, Kanako Fuji¹, Takashi Sakamoto¹, Osamu Hasegawa², Ichiro Nakayama³, Takanori Kobayashi³, Kagayaki Morishima³, Hiroyuki Okamoto⁴, Nobuaki Okamoto¹.

¹Department of Marine Sciences, Tokyo University of Marine Science and Technology, Minato, Tokyo 108-8477, Japan.

²Kanagawa Prefectural Fisheries Institute, Miura, Kanagawa 238-0237, Japan.

³National Research Institute of Fisheries Science, Yokohama, Kanagawa 236-8648, Japan.

⁴National Research Institute of Aquaculture, Shima, Mie 516-0193, Japan

A genetic linkage map of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* has already been done based on microsatellite and AFLPs markers. For the construction of this map, 149 microsatellite markers and 64 AFLPs markers were used. The female linkage map consisted of 27 linkage groups and the male of 25. However, it is well-known that in the construction of detailed maps of some domesticated animals, a bigger amount of markers was used. Moreover, previous studies have revealed that the chromosome number of this species is 23. Therefore, it is evident that there is still a need for the development of a more detailed genetic linkage map of the Japanese flounder. Consequently, efforts are being made to achieve this objective. In this study, progresses in the creation of the detailed genetic map of the Japanese flounder will be presented. At the present moment, an exhaustive look for microsatellite markers in this species is being done. In addition, EST markers will also be used. Furthermore, genome data of puffer fish, as well as zebra fish will be used to the determination of economically important structural genes, through an analysis of synteny between the different species.

ヒラメのリンホシスチス病に対する抵抗性遺伝子座の特定

藤 加菜子 (海洋大)・長谷川 理 (神奈川水総研)・小林 一展

・M.R.M COIMBRA・坂本 崇・岡本 信明 (海洋大)

有用形質を固定し品種化する試みは、家畜や植物では古くから行われており、多くの品種が存在するが、養殖対象種では品種化されたものはほとんどないのが現状である。近年開発された DNA マーカーを利用した QTL 解析による有用形質関連遺伝子(座)の特定は、ヒトの遺伝性疾患や家畜・植物などの有用形質の原因遺伝子(座)を明らかにし、家畜や植物では原因遺伝子座と連鎖する DNA マーカーを用いた選抜育種(マーカーアシスト選抜)へと発展している。本法の特徴は表現型を支配する遺伝子と連鎖する DNA マーカーを指標として育種することができるため、従来の表現型のみによる育種に比べてより確かな親魚の選抜が可能になるばかりでなく、目的形質を支配する遺伝子以外の遺伝子に多様性を持たせることが可能な為、従来法による選抜育種で問題となる近交弱勢を回避できる点にある。

本研究ではヒラメ養殖において経済的損失を与えているウイルス病の一つ、リンホシスチス病(LD)に着目した。現在のところ LD に対する有効な薬剤はなく、ワクチン開発を目指した研究は行われているが、商品化への目途は立っていない。そこで、このような現状において、申請者は LD の被害を育種によって軽減することを考え、マーカーアシスト選抜による LD 抵抗性品種の確立に必須である LD 抵抗性遺伝子座の特定を QTL 解析によって行った。

解析家系には、LD に抵抗性を有する系統(KP-B)由来の雌と感受性を有する系統(KP-A)由来の雄の F1 で、LD に抵抗性を示した雌(KP-BA)と、父親である感受性系統の雄(KP-A)を交配した戻し交配家系(KP-BAA)を用いた(n=136)。これらの個体をピットタグにより識別し、2001 年 2 月から LD 発症／非発症を自然感染により記録し、5 月の LD 発症／非発症を表現型とした。LD 抵抗性遺伝子座の特定には、Coimbra *et al.* (2002) によって作製された地図を参考にして、各連鎖群から少なくとも一つのヒラメマイクロサテライトマーカーを用い、マイクロサテライトマーカーが示す遺伝子型と LD 表現型との間の連鎖解析を行った。

その結果、一つの連鎖群(連鎖群 15)に属する複数のマイクロサテライトマーカーの遺伝子型と LD 抵抗性の表現型とが連鎖することを見出し、ヒラメ LD 抵抗性遺伝子座の座位を特定することに成功した。

本研究結果は、QTL 解析法の水産育種への有用性を示すと同時に、ヒラメの LD 抵抗性を育種目標としたマーカーアシスト選抜への道を開くものであると考える。

アマゴ遺伝子連鎖地図の作製とスモルト化関連遺伝子座のマッピング

原拓矢・長瀬崇(海洋大)・桑田知宣・徳原哲也(岐阜淡水研)・

尾崎照遵・坂本崇・岡本信明(海洋大)

スモルト化は表現型の分布が連続的である量的形質(quantitative trait)と考えられ、一般に複数の遺伝子(座)が関与することが多く、遺伝子座特定のための解析には遺伝子連鎖地図を利用した遺伝子解析法である QTL 解析(quantitative trait locus)が有効である。QTL 解析は各個体について得られる DNA マーカーの分離型と形質の表現型値を観察データとして、対象の量的形質に関与する QTL の数や各 QTL の連鎖群上の位置などを特定できる。そこで本研究では、スモルト化について QTL 解析を行うために必須であるアマゴ遺伝子連鎖地図を作製すると同時に、スモルト化に関連する遺伝子座の特定を行なった。

スモルト化に関連する遺伝子座を特定するためには、スモルト化率に違いのある系統を用いることが解析を容易にする。そこで解析家系には岐阜県淡水魚研究所で継代飼育されてきたパー、スモルト分化に大きな違いの見られるスモルト系統(C3 系)とパー系統(G4 系)の両系統から F_1 を作出し、雄の F_1 個体を G4 系の雌個体に交配して作出した戻し交配家系(雄家系)を用いた。この戻し交配家系とマイクロサテライトマーカー184 個(アマゴ 139 個、他のサケ科魚類 45 個)を用いて QTL 解析を行い、アマゴ遺伝子連鎖地図の作製とスモルト化に関連する遺伝子座の探索を行った。その結果、110 遺伝子座、29 連鎖群からなるアマゴ雄の遺伝子連鎖地図を作製することができた。また、その連鎖地図上の 4 つのマイクロサテライトマーカー(連鎖群 3 に 3 つと連鎖群 21 に 1 つ)においてスモルト化との関連を見出した。

この雄家系では連鎖群 3 上の 3 つのマーカー(Omi127/iTUF、Omi174/iTUF、OmiFGT8/iTUF)間には組換えがなく、各マーカーとスモルト化関連遺伝子座の位置関係を把握することはできなかった。そこでサケ科魚類の雌は雄より組換え率が高いことを利用して、雌の F_1 個体を G4 系の雄個体に交配して作出した戻し交配家系(雌家系)を解析することで各マーカーとスモルト化関連遺伝子座の位置関係を特定した。その結果、3 つのマーカーのうち Omi174/iTUF が最もスモルト化関連遺伝子座に近いことが分かった。

マダイマイクロサテライト連鎖地図の作製とイリドウイルス耐病性形質に関する解析

○稲見麻琴（海洋大）・畑中晃昌・三星亨・山田彰一（日水中研）・

福田穎穂・坂本崇（海洋大）

海産養殖生産量の約 1/3 を占めるマダイ養殖において、近年マダイイリドウイルス(RSIV)による被害が増加している。RSIV による被害を軽減するために、選抜育種による RSIV 耐性マダイ作出がすすめられているが、選抜育種は数世代にわたる飼育が必要であり、また継代飼育による遺伝的多様性の低下が問題とされている。

家畜ではこれらの問題を解決するために、マーカーアシスト選抜(MAS)育種研究が進められており、魚類においても有効な育種方法として研究され始めている。現在ナマズや養殖エビの種苗生産で実用化されている。

RSIV 耐性形質に対する MAS 育種技術を開発することで、遺伝情報に基づいて養殖マダイ集団に耐性形質を固定することが可能になり、遺伝的多様性を低下させずに RSIV の被害を軽減できると期待されている。MAS 育種技術の開発には、連鎖地図と有用形質に関わる遺伝子座の解析 (QTL 解析) が必要であり、さらに QTL 解析には有効な家系と DNA マーカーの開発が不可欠である。数多くの DNA マーカー、特にマイクロサテライトマーカーを開発し、連鎖地図を作製することは産業上非常に有益であると同時に、連鎖地図によるマダイゲノムの理解は生物学的側面からも価値あるものとする。そこで本研究では、マダイマイクロサテライトマーカーを数多く開発し、蛍光プライマーを用いた PCR と自動解析機を組み合わせた効率的な解析方法の条件検討を行う。また開発したマイクロサテライトマーカーと RSIV 耐性形質のリンケージ解析をおこない、連鎖地図の作製を試みた。

まずマダイマイクロサテライトマーカーの開発を行い、247 個のマイクロサテライトマーカーを開発した。開発したマイクロサテライトマーカーを用いて、マダイマイクロサテライト連鎖地図の作製を行った。連鎖地図作製には、RSIV 耐性系統と感受性形質系統とを交配した F1 に感受性系統を戻し交配した家系を用いた。これまでに、132 マイクロサテライトマーカーが配置されたマダイマイクロサテライト連鎖地図を作製した。今回作製されたマダイマイクロサテライト連鎖地図においても、ニジマスやヒラメなどの魚種で報告されている同一マーカー座間における雌雄の組み換え率に違いが見られた。そこで、雌雄特異的なマイクロサテライト連鎖地図を作製した。メスの連鎖地図は 28 連鎖群からなり全長 708.5 cM、オスの連鎖地図は 26 連鎖群で全長 609.1 cM であった。マダイイリドウイルス耐病性形質の解析には、戻し交配解析家系に対して RSIV による攻撃試験を行い、生存した群と死亡した群に表現型を分け Mapmanager QT を用いて解析を行った。その結果、現在までに 6 連鎖群で 6 つの QTL マーカーが得られた。

硬骨魚類におけるチオエステル含有タンパク質ファミリーの 遺伝子多重化とその機能分化

中尾実樹・無津呂淳一・加藤陽子・小宮あすか・C. J. Bayne

(九州大学大学院農学研究院・オレゴン州立大学)

補体系は、系統発生的に古い起源を持つ生体防御タンパク質群であり、哺乳類では、抗原に結合した抗体依存のおよび非依存的に活性化されて異物細胞の破壊やオプソニン化・炎症反応の惹起・抗体産生応答の調節など多様な活性を示す。魚類の補体系は哺乳類に匹敵する程に完成されていると考えられるが、近年、硬骨魚類では多くの補体成分遺伝子が多重化しているという際立った特徴が報告されている。補体成分 C3/C4/C5 は血清プロテアーゼインヒビターである α_2 -マクログロブリン(A2M)と祖先を共有する、チオエステル含有タンパク質である。これまでいくつかの魚種で C3 が複数のアイソタイプとして存在し、それらが異物に対する結合特異性などの点で異なる活性を示すことが判明している。コイでは C3 以外にも、このファミリーに属する補体成分 C4、C5 に加えて、A2M も複数のアイソタイプとして存在する。C4 アイソタイプ(C4-1, C4-2)には、C3 の場合と同様に、チオエステルの異物に対する結合特異性を支配するアミノ酸の置換が認められる。一方、チオエステル構造を失っている C5 の場合、2 種の C5 アイソタイプ(C5-1, C5-2)は異なる発現パターンを示す。さらに、A2M アイソタイプ間では、プロテアーゼの阻害に必須のベイト領域および阻害 (=捕獲) したプロテアーゼのクリアランスに重要な役割を果たすレセプター結合部位に変異が見つかった。A2M 遺伝子の多重化はコイのみならずニジマスでも認められ、ニジマス A2M アイソタイプ間には少なくともベイト領域に高度な多様性が見られる。以上の結果は、硬骨魚類ではチオエステル含有タンパク質ファミリー全体が多重化した遺伝子によってコードされており、それらの遺伝子産物は機能的に多様化していることを示唆する。

Ontology of rapidly evolving immuno-hematopoietic growth factors: the case of granulocyte colony-stimulating factors (GCSFs) from teleosts

Mudjekeewis D. Santos, Motoshige Yasuike, Ikuo Hirono and Takashi Aoki

Laboratory of Genome Science, Tokyo University of Marine Science and Technology, Konan 4-5-7

Minato-ku, Tokyo, 108-8477

About 25 – 30% of mammalian genes are yet to be identified and/or predicted in lower vertebrates, even with the near completion of the fish and chicken genomes, because they are thought to be rapidly evolving hence possess limited conservation of sequences that renders existing homology- based prediction algorithms ineffective. Granulocyte colony stimulating factor (GCSF) is one such unidentified gene, a cytokine with important immuno-hematopoietic properties that mediates the proliferation, differentiation, maturation and survival of neutrophils and their precursors, and used extensively in cancer therapy and in the treatment of neutropenia in mammals. Through cloning and the subsequent, manual and exhaustive utilization of available genome resources, we report the first and definitive identification of GCSF genes from 3 teleost fishes: Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), fugu (*Takifugu rubripes*) and green spotted pufferfish (*Tetraodon nigroviridis*). These genes, confirmed to be the teleostean GCSF orthologues, were also found to be paralogous consistent with the whole genome duplication theory (WGD) in teleosts, albeit the Japanese flounder GCSF duplicate is presumed thus far. While indeed, these orthologues have low and varying levels of identity in their sequences, which is indicative of being in a rapidly evolving state, their gene features and structure, domains, hydrophobicity and synteny, as well as motifs in their non-coding regions have significant conservation and are thus potential functional elements. The mammalian GCSFs are apparently under purifying selection while the fish GCSF, except *trGCSF-1*, are positively selected. We observed thru predicted structure and tissue expression that the fugu and green spotted pufferfish GCSF paralogues likely followed an opposite evolutionary pathway, i.e. they have undergone ‘nonfunctionalization’ and ‘subfunctionalization’, respectively. The fish GCSF, thru the Japanese flounder is likewise shown *in vitro* to be at least involved in immunity based from its basal expression in immune-related tissues/organs and reaction to immunostimulants. Finally, this study presents evolutionary relationships among the sequence/structure-related but functionally-divergent mammalian cytokine genes; GCSF, Interleukin-6 (IL-6), Oncostatin M (OSM) and Leukemia Inhibiting Factor (LIF); and the chicken Myelomonocytic Growth Factor (cMGF) using the fish GCSFs as “fossil outgroups”.

魚類の CYP1A、-1B、および-1C の各種臓器における遺伝子発現

板倉 隆夫

鹿児島大学・水産学部

シトクロム P450 (CYP)は、多数の遺伝子が遺伝子スーパーファミリーを形成している。その中の CYP1 ファミリーに属する遺伝子は、ダイオキシンなどの化学物質によって誘導されることから、環境科学の分野で注目されている。我々は、魚類 CYP1 遺伝子の基礎的研究と発現調節領域の応用について研究を進めているが、その過程で、現在まで報告例の少ない CYP1B について、ウナギの 1B1 とコイの 1B1 および 1B2 の cDNA を単離し、塩基配列を決定した。この 1B2 は新奇の遺伝子である。また、論文としてまだ報告が無い CYP1C については、ウナギの 1C1 とコイの 1C1 および 1C2 の cDNA を単離し、塩基配列を決定した。

コイの CYP1 ファミリー遺伝子の各臓器における発現を調べたところ、下の表に示すように、1) 1A は、肝、腎、腸、および鰓で誘導される、2) 1B1 は、肝および腸で誘導され、鰓では構成的発現を示す、3) 1B2 は、調べた臓器の中では鰓でのみ誘導される。4) 1C1 は、同じく鰓でのみ構成的に発現している、5) 1C2 は、同じく腎でのみ誘導される、という興味深い結果を得た。なお、誘導には 3-methylcholanthrene(3-MC) あるいは β -naphthoflavone (BNF) を用いた。

次に、インバース PCR 法を用いて、ウナギの 1B1 (2292bp)、コイの 1B1 (689bp) および 1B2 (769bp) の遺伝子 5'上流域を単離して塩基配列を決定したところ、それぞれに XRE(DRE) 配列、そしてウナギの 1B1 に ERE 様配列が認められた。ウナギ 1B1 の 5'上流域と GFP 遺伝子を連結してメダカに導入したところ、BNF に応答して緑色の蛍光を発した。既に報告しているウナギの 1A 遺伝子の 5'上流域を用いたトランスジェニックメダカについては、導入遺伝子が生殖細胞系列に組み込まれた F0 と F1 を得た。

表 コイの CYP1 ファミリー遺伝子の各種臓器における発現

Carp	Liver		Kidney		Intestine		Gills	
	C	I	C	I	C	I	C	I
CYP1A	+	++	-	+	-	+	-	+
CYP1B1 -	+			-	+	+	+(++)	
CYP1B2 -	-			-	-	-	+	
CYP1C1 -	-	-	-	-	-	+	+	
CYP1C2 -	-	-	+	-	-	-	-	

C: Control, I: Induced (CYP1A、-1B1、-1B2 では 3-MC、CYP1C1、-1C2 では BNF を使用)

水産DNA多型データベース構築の試み

小林敬典独立行政法人水産総合研究センター中央水産研究所

実験データと生物学情報の比較は、研究を行う上で非常に重要である。この作業で重要な役割をする物にデータベースがある。水産総合研究センターでは、マイクロサテライト多型を中心としたDNA多型情報と水産生物情報を一元管理するデータベース「水産生物DNA多型情報データベース」の構築を試みている。本システムは、DNA情報と形態、生態、病気、実験方法、画像データ、各種文献などを一元管理できる機能を有し、このシステムの構築によって遺伝情報に関連する情報が簡単に誰でも取り出せ、煩雑であった遺伝情報の効率利用が可能とすることを目的としている。また、各魚種の特徴を分かりやすく記述してあるので、インターネット水産生物図鑑としても使用できる。

本システムは、マザーデータベースに当たる水産総合研究センターで管理する水生生物データベースとリンクし、誰でも簡単に水産研究の先端成果をすぐに取り出せ、すぐに活用できるように設計されている。このようなシステムは、既存のデータベースには無く、本システムが、ゲノム研究で初めての試みとなり、本システムの運用に伴い、水産分野から生命情報学分野への情報発信が行われるようになった。本データベースは、世界3大データベースの一つである国立遺伝学研究所の日本DNAバンク(DDBJ)とリンクし、DNA配列情報の登録、取得が簡単に行えるように設計されている。

DDBJに格納されているDNAデータは塩基配列のみである。実際の研究では、DNA上の繰り返し配列であるマイクロサテライト等のDNA配列上の変異部分を利用したDNA多型解析を行っている場合が多い。DNA多型情報を整理し、使いやすく加工しているデータベースは無く、利用者が個人で管理しているのが現状である。本システムは、水産分野で利用率が高くなっているこの研究分野に対応するように設計を試みた。また、遺伝情報と生物情報の蓄積が大きいヒラメをモデル生物として、マイクロサテライト解析、AFLP解析など水産分野で用いられるDNA多型分析法を中心にDNA多型情報とリンクする形態、生態、魚病等の生物情報をインターネット上に公開し、耐病性や集団の識別が可能となる遺伝情報の公開に努めている。