

平成 22 年 6 月 7 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19310125

研究課題名（和文）古代魚ポリプテルスをもちいた進化と発生に関する基礎的研究

研究課題名（英文） Developmental and Evolutionary Analysis of Ancient Fish (*Polypterus*)

研究代表者

成瀬 清（NARUSE KIYOSHI）

基礎生物学研究所・形質転換生物研究施設・准教授

研究者番号：50208089

研究成果の概要（和文）：

**培養細胞系の樹立：**ポリプテルス成魚の鰭・腎臓及び胚期の個体を用いて初代培養細胞系の樹立をおこなった。その結果、初期には細胞の遊走が見られ、増殖も確認することができた。しかしその後、急速に細胞死がおこり、全細胞が死滅するという現象が繰り返し見られた。培養条件を変えることによって細胞培養系の樹立を試みたが安定した初代培養細胞系は得られていない。

**フォスミドライブラリーの作成と進化遺伝学的解析：**フォスミドベクターによって約 50 万クローンよりなるゲノムライブラリーを作成した。Gcm2、Elov15、Fbox93 遺伝子をプローブとしてゲノムライブラリーをスクリーニングした結果、3 遺伝子のうち 1 遺伝子に関しては当該クローンを得ることができた。しかしクローンが得られた遺伝子数が少ないことから、50 万クローンでもいまだ十分なゲノムカバー率に達していないことが判明した。

研究成果の概要（英文）：

**Establishment of cultured cell line:** We have been established the primary cell culture from fin, kidney and embryos of *Polypterus senegalus*. Initial phase of cell culture, cells were growing well. After several passages, most of cells were rapidly dying by apoptosis. This phenomenon was observed in fins, kidney and embryo. Although we have changed several culture conditions such as medium and collagen coated dish, all efforts were not successful.

**Construction of fosmid library and evolutionary genetic analysis:** We have constructed the *Polypterus* genomic library with fosmid vector system. Independent colony members of this library reached over 500,000. After PCR screening of three genes (*Gcm2*, *Elov15*, *Fbox93*), single positive clone with the *Elov15* gene was identified. This result suggests the genome coverage of this fosmid library was not high enough for isolation of arbitrary genes in *Polypterus* genome.

交付決定額

（金額単位：円）

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2007年度 | 5,900,000  | 1,770,000 | 7,670,000  |
| 2008年度 | 4,600,000  | 1,380,000 | 5,980,000  |
| 2009年度 | 5,000,000  | 1,500,000 | 6,500,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 15,500,000 | 4,650,000 | 20,150,000 |

研究分野： 複合新領域

科研費の分科・細目：ゲノム科学・基礎ゲノム科学

キーワード：ゲノム進化・再編 古代魚

## 1. 研究開始当初の背景

我々は特定領域研究C「統合ゲノム」の援助によってメダカゲノム解析をおこなってきた。平成18年10月現在で既にドラフトレベルの解析が終了している。今回の解析では700M bpのあまりの塩基配列を決定し、その90%を連鎖地図上に一意的に配置することが出来た。この高精度なメダカゲノム配列と5' SAGE法とGenScanを組み合わせた遺伝子予測によって約20000の遺伝子を同定した。このデータとヒトゲノム配列を比較することで、我々は真骨類の共通祖先で起こったと考えられる全ゲノム倍加以前の祖先が持っていたと予想される13対の祖先染色体を同定することができた。またその祖先ゲノムから全ゲノム倍加を経て、現生のゼブラフィッシュ、ミドリフグ、メダカにいたる進化のシナリオを再構成することが出来た。それではこの再構成の妥当性をどのように検証すれば良いのであろうか。もっとも直接的な方法は“全ゲノム倍加を経していない条鰭類のゲノム構成”を明らかにして、それを“我々が再構成した祖先ゲノム”と比較することである。これが同じならば、我々の再構成の正しさを強く示すことが出来る。Hox遺伝子等を持ちいた系統解析の結果から、“古代魚”と言われる一群の条鰭類（全骨類（アミアやガアの仲間）、軟質類（チョウザメの仲間）、ポリプテルス（Hoegg et al. *J. Mol. Evol.* 59:190-203, 2004）は真骨類の共通祖先で起こったゲノム倍加より以前に分岐していることが示唆されている。もしこれらの系統がもつゲノム構成と我々が再構成した祖先ゲノムとの間に類似性が十分に見られれば（シンテニーが保存されていれば）、我々の再構成過程の正しさを証明することが出来る。ここで問題となるのはどのような種を選択し、比較するのかという点である。軟質類のチョウザメでは系統によってその染色体数は30対から250対にまで変化する。チョウザメ類では真骨類の共通祖先で起こったゲノム倍加とは異なる系統特異なゲノム全体の倍加が起こったことも報告されている（Ludwig et al. *Genetics* 158:1203-1215, 2001）。全骨類のアミアやガーでは、染色体数はそれぞれ23対、34対と報告されている（<http://www.genomesize.com>）。つまり軟質類や全骨類では予想された13対に比べ、より多数の染色体を持つわけである。もし

我々が再構成した条鰭類共通祖先の染色体数が正しいのならば、これらの種では少なくとも染色体の分断か、特定染色体の倍加のような染色体数が増えるような変化が起こったものと考えられる。現在までに染色体数が報告されている古代魚の中で13対の染色体を持つものは知られていないが、これら古代魚のなかで予想された13対に最も近い染色体数を持つ種はポリプテルス（18対）である。今回の計画ではこのポリプテルスを用いて、そのゲノム構成を染色体FISH法によって解析し、遺伝子の連鎖関係明らかにし、その結果を我々が再構成した条鰭類共通祖先の染色体構成と比較することで、再構成の妥当性を検討することを第1の目的としている。第2の目的はポリプテルスのゲノムリソースを整備し、進化発生生物学の材料として確立することである。ポリプテルスは分担者の岡部正隆博士によって、安定に採卵し発生を観察する系が樹立されている。ポリプテルスの発生は真骨類（ゼブラフィッシュやメダカ）と大きく異なる。通常真骨類が盤割し、覆被せ運動によって発生するのに対し、ポリプテルスでは両生類胚と同様に全割し、通常陥入をおこなう。また肺や外鰓を持つなど、成体の体制も真骨類とはかなり異なる。このような特徴からゼブラフィッシュやメダカをもちいて解析されてきた真骨類の発生と両生類や哺乳類をもちいて解析されてきた四足動物の発生とをつなぐ系統として、ポリプテルスは注目され、その発生過程を調べる研究者も少しずつ増えてきている。今回の研究ではゲノム進化という側面に加え、ポリプテルスのゲノムリソースをもちいて、進化発生学的研究をおこなう。両生類を除く四足動物は完全に水から離れた生活様式をとるが、両生類の幼生は酸素分圧の低い浅瀬の水中で生活し、そのために大きな外鰓を持っている。両生類は変態期に肺が発達すると同時に外鰓が退縮する。有尾両生類のアホローは外鰓を持つが肺がないことと、エアレーションを十分にすると外鰓が小さくなってしまふことなどから、外鰓は酸素分圧が低い環境に適応するために発達した器官だと考えられる。魚類の中で外鰓を持つのはポリプテルスと、プロトプテルスなどの南米とアフリカのハイギョだけである。オーストラリア肺魚のネオケラトドゥスには外鰓はないが、彼らは肺呼吸もほとんどしない。彼ら

は他の真骨類同様に低酸素でも問題ない内鰓と代謝系を発達させたのだと考えられる。これらのことをふまえ、今回の研究では第2のテーマとして両生類とポリプテルスの外鰓と肺が同じ起源のものなのか、それとも収斂進化の産物なのかを調べる。もし両生類の外鰓と肺がポリプテルスのものと同じだとすると、四足動物と条鰭類の共通祖先は、外鰓と肺を持っていた浅瀬の魚類であると推定できる。一方収斂進化であれば、そのかぎりではない。という興味深い結論が得られる。

## 2. 研究の目的

ポリプテルスを用いて、そのゲノム構成を染色体 FISH 法によって解析し、遺伝子の連鎖関係明らかにし、その結果を我々が再構成した条鰭類共通祖先の染色体構成と比較することで、再構成の妥当性を検討する。ポリプテルスのゲノムリソースを整備し、進化発生生物学の材料として確立する。

## 3. 研究の方法

**(1) 培養細胞系の樹立：**研究分担者の岡部博士よりポリプテルス (*Polypterus senegalus*) を提供していただき培養細胞系を1個体ごとに複数系統を樹立する。

次亜塩素酸と70%エタノールをもちいて体表を滅菌し、腎臓等の組織を取り出し、そこに15%牛胎児血清を含むL-15培養液を少量滴下する。滅菌したカバーガラスによって碎片化した組織を覆うことで培養皿との組織を密着させる。これによって効果的に細胞を遊走させることができる。その後15%牛胎児血清を含むL-15培養液を加え、更に培養を続ける。細胞が培養皿の半分程度になったところで、静かにカバーガラスをはがす。3日に1回程度半分量の培養液を交換しながら、培養皿の90%程度まで細胞が増えるのを待つ。トリプシン-EDTAによって細胞を培養皿からはがし、3cm培養プレート2枚にわける。

培養細胞を1:2に分けながら、75 cm<sup>2</sup> フラスコ30本程度まで細胞を増やす。一部分を液体窒素中で凍結保存するとともにエアードライ法によって染色体標本作製し、核型分析をおこない、培養に伴う染色体欠損や倍加がないことを確認する。

**(2) ゲノムライブラリーの作成：**培養細胞よりゲノムDNAの抽出をおこないフォスミドベクターかBACベクターをもちいてゲノムDNAライブラリーの作成をおこなう。Proteinase K, EDTAを含むバッファー中で培養細胞をインキュベート (55°Cで3時間) し、細胞を溶解するし、ショ糖密度勾配遠心によって高分子量DNA分画を分収し、パ

ルスフィールド電気泳動によって分収したDNAの分子量を測定する。

およそ40 k bpになるようにハイドロシェアーによってDNAを裁断する。DNAの末端修復をおこない平滑化した後、パルスフィールド電気泳動によって、DNAをサイズ分画して35 kbp付近のDNAを切り出す。

ゲラーゼによってアガロースゲルを分解したのち、DNAの抽出と濃縮をおこなう。pCCFosベクターとDNA断片をライゲーションし、インビトロパッケージングをおこないゲノムライブラリーの作成をおこなう。

**(3) 進化発生生物学的研究：**ゼノパスをもちいて、外鰓形成に関与する遺伝子ネットワークを Whole mount in situ hybridization (WISH) 法とモルフォリーノアンチセンスオリゴによる遺伝子のノックダウンによって明らかにする。

## 4. 研究成果

### (1) 培養細胞系の樹立

ポリプテルス鰭をもちいて15%牛胎児血清を含むL-15培養液により培養細胞系の樹立を行ったが一時的に細胞が増えた後に、急速に細胞死がおこり、全細胞が死滅するという現象が繰り返し見られた。そのためコラーゲンコートした培養皿や無血清培地等をもちいて、培養条件を変えることによって細胞培養系の樹立を試みたが安定した培養細胞系は得られていない。発生途中の胚をもちいた培養細胞系の樹立も試みたが、一部の細胞は培養皿に定着して増殖を行うが大部分の細胞は浮遊したままで、細胞増殖しない。腎臓をもちいて培養細胞系の樹立をおこなったが、この場合も鰭と同様の結果であった。

### (2) ゲノムライブラリーの作成

ポリプテルスセネガルス個体からゲノムDNAを抽出し、約37kbpのDNA断片をパルスフィールド電気泳動法によって分離した。pCCFOS1ベクターにゲノムDNA断片をライゲーションし、インビトロパッケージング法によってファージ粒子にパッケージングした後、EPI300大腸菌に感染させフォスミドライブラリーを構築した。当初構築したライブラリーサイズは約20万クローンであった。まず10万クローン分をもちいて、1プレートあたり約2000コロニーの大腸菌を蒔き、全てのコロニーを回収後、その一部からフォスミドDNAを抽出した。以上の作業をプレート48枚分おこないプールDNAライブラリーを作成した。作成したライブラリーを分担者の岡部博士に送り、Gcm2, Elov15, Fbox93 遺伝子をプローブとしてゲノムライブラリーをスク

リーニングした。その結果 Elov15 を含む  
フォスミドクローンを1クローンだけ得  
た。今回作成したゲノムライブラリーのサ  
イズは約 3700M bp 程度であることを考え  
るとポリプテルスセネガルスは少なくと  
も 4G bp 程度のゲノムサイズをもつこと  
を示唆している。これを考えると 37k bp の  
インサートサイズのフォスミドをもちい  
てライブラリーを作成すると、最低でも 50  
万コロニー程度のライブラリーを作成す  
る必要があると予想された。このためさ  
らに 30 万コロニーのライブラリーを作成し、  
合計 50 万コロニーよりなるライブラリー  
を作成した。クローンのスクリーニングに  
よりゲノムカバー率の推定をおこなった  
が同一遺伝子を含む複数のクローンを得  
ることはできなかった。この結果からポリ  
プテルスゲノムを十分にカバーするゲノ  
ムライブラリーをフォスミドベクターに  
より作成するためには 100 万コロニー以  
上のライブラリーを作成する必要があると  
推定された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に  
は下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- ① Takeuchi M, Takahashi M, Kuratani S, Okabe M, Aizawa, S. Germ layer patterning in bichir and lamprey; An insight into its evolution in vertebrates. *Dev Biol.* 332(1):90-102 (2009) (査読有)
- ② Fukui A, Yokoo T, Matsumoto K, Kawamura T, Hosoya T, Okabe M. Integration of human mesenchymal stem cells into the Wolffian duct in chicken embryos. *Biochem Biophys Res Commun.* 385(3):330-335 (2009) (査読有)
- ③ Kasahara, M, Naruse, K, et al The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. *Nature* 446:714-719 (2007) (査読有)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 岡部正隆 呼吸器の構造進化 ～脊椎動物の上陸の前後～ 第 115 回日本解剖学会総会・全国学術集会 2010 年 3 月 28 日
- ② 岡部正隆 脊椎動物の上陸と咽頭の形態進化 第 50 回日本組織細胞化学会総会・学術集会 2009 年 9 月 26 日～27 日
- ③ Masataka Okabe EVOLUTION OF THE VERTEBRATE PHARYNX. The 36th Congress

of the International Union of  
Physiological Sciences. July 31 2009

- ④ Masataka Okabe Transition from Aquatic to Terrestrial Life And Evolution of the Vertebrate Pharynx. THE XIth OXFORD CONFERENCE ON MODELLING AND CONTROL OF BREATHING-NEW FRONTIERS IN RESPIRATORY CONTROL-呼吸調節研究における新展開. July 24-26 2009
- ⑤ Masataka Okabe Transition from Aquatic to Terrestrial Life And Evolution of the Vertebrate Pharynx. The 3rd International Symposium of the Biodiversity & Evolution Global COE Project. July 24-25 2009

[図書] (計 4 件)

- ① Kinoshita, M, Murata, K, Naruse, K and Tanaka, M Medaka: Biology, Management, and Experimental Protocols. 1-419 (2009)
- ② Takeuchi M, Okabe M, Aizawa S. The Genus *Polypterus* (Bichirs): A Fish Group Diverged at the Stem of Ray-Finned Fishes (Actinopterygii). *CSH Protocols.* 447-467 (2009)
- ③ Takeuchi M, Okabe M, Aizawa S. Whole-Mount In Situ Hybridization of Bichir (*Polypterus*) Embryos. *CSH Protocols.* 458-459 (2009)
- ④ Takeuchi M, Okabe M, Aizawa S. Microinjection of Bichir (*Polypterus*) Embryos. *CSH Protocols.* 460-462 (2009)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

成瀬 清 (NARUSE KIYOSHI)

基礎生物学研究所・形質転換生物研究施設・准教授

研究者番号：50208089

##### (2) 研究分担者

岡部 正隆 (OKABE MASATAKA)

東京慈恵会医科大学・医学部・教授

研究者番号：10300716