

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19700372

研究課題名 (和文) ゼブラフィッシュ近交系の樹立

研究課題名 (英文) Establishment of inbred strains in zebrafish

研究代表者

新屋 みのり (SHINYA MINORI)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・助教

研究者番号：00372946

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：実験動物学・実験動物学

キーワード：育種遺伝、ゼブラフィッシュ、近交系、遺伝学

### 1. 研究計画の概要

小型魚類であるゼブラフィッシュは、実験発生学的手法・分子生物学的手法・遺伝学的手法を用いることのできる優れたモデル動物である。しかし、ゼブラフィッシュには近交系がなく、この点が遺伝学を用いるモデル動物として大きな弱点となっている。近交系が未だない理由として、鳥類のように近交退化が激しいため近交系ができないという意見と、10年近くかかる地道な仕事であるため誰も真剣に試みていないという意見があり、いずれが正しいのか定かではないのが実情である。本研究課題では、20世代の兄妹交配を重ねてゼブラフィッシュ近交系の樹立を目指すと共に、ゼブラフィッシュにおける近交退化の強さを見極めることを目的とする。

近交系はゼブラフィッシュの野生型 2 系統 (Tubingen 系統・India 系統) からの樹立を試みる。各世代 5 ペアから採卵して産卵数・受精率・死亡率・発生異常の有無のデータを取得し、最も良いペアの仔魚から次世代のペアを作成する。以上を 20 世代繰り返すことで近交系を樹立する。尚、孫の代が問題なく産卵することを確認した後に、各ペアをエタノール固定して保存する。

また、遺伝マーカーを用いてホモ化の様子をモニタリングする。これは、近交系樹立におけるトラブルの代表である魚のコンタミネーションに備えた確認作業である。最初に、0 世代目のペアでなるべくヘテロ接合になった遺伝マーカーを染色体 1 本につき 2 個選択しておく。このマーカーセットにより、次世代へと継代する候補ペアの遺伝子型決定を行い、コンタミネーションがないことを確認した後に継代に用いる。万が一、コンタミネ

ーションが起きていた場合には、前の世代に戻って継代をやり直す。

### 2. 研究の進捗状況

#### (1) 遺伝マーカーの選択

遺伝的モニタリングのため、ゼブラフィッシュの 25 対の染色体それぞれにつき 2 個、合計 50 個の遺伝マーカーを選出した。選出の基準としては、近交系化を進めている 2 系統それぞれの系統内で①多型が報告されているか、あるいは 0 世代目にて多型が確認できているか、かつ②1 世代目へのアレルの継承が矛盾無く観察されたマーカー、とした。

#### (2) Tubingen 系統の近交系化進捗

12 世代目までの継代は順調に進捗した。0 世代目にて 52% のマーカーでヘテロ接合であったのが、9 世代目には 16%、11 世代目には 6% のマーカーのみがヘテロ接合になり、コンタミネーションもなくホモ化が進んでいることが明らかであった。しかし、13 世代目ペアからの胚が全て致死の発生異常を示した。9 ペアを作成したが、いずれのペアからの胚も全てが共通の表現型を呈し、継代不能となった。前世代へ戻ってペアを作成しなおすなどの努力を行なったが、魚の加齢に追いつかず、採卵できなくなり絶えてしまった。

#### (3) India 系統の近交系化進捗

これまでに 16 世代目までのペア作成を行なった。14 世代目ペアの作成以降、Tubingen 系統の近交退化の経験を元に継代ペア選択の戦略に修正を加えている。個体サイズが小さく、採卵バッチによっては浮腫や受精後 1 ヶ月程度での致死が高頻度におこるなどの問題が出ており、適切な飼育条件がより狭くなっている感がある。しかし、飼育条

件さえ合っておれば順調に継代できている。0世代目では84%のマーカ―がヘテロ接合であったが、15世代目では2%のマーカ―のみがヘテロ接合となった。コンタミネーションもなく順調に近交系化されている。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

近交系化を試みた片方の系統は絶えてしまったものの、片方は予定したとおりのスピードで継代を進められている。また、ゼブラフィッシュの近交退化の強さを知ることにも出来た。さらに、1系統絶やしてしまった経験を他方の継代方法に生かしており、残る1年で20世代の兄妹交配が達成でき、近交系の樹立を完了させられる可能性が非常に高い。以上、当初の目的をほぼ達成できそうであるため、おおむね順調との評価をした。

### 4. 今後の研究の推進方策

(1) **India** 系統の継代を進める。現在16世代目のペアを作成しており、あと3回の継代を1年以内に完了させて20世代を達成する。

(2) 万が一 **India** 系統の近交系化にも問題が発生して継代できなくなる可能性を考え、各世代1つのグループ・メイティングを行って維持する。これにより、近交系の定義を満たすだけの交配が達成できなくとも、非常に均一な遺伝的背景を持つ(>98%ホモ接合)クローズド・コロニーは樹立できる。ゼブラフィッシュ研究者への有効なリソースとして魚を提供できるようにする。

(3) 近交系化の保証として、ウロコ移植による同系統異個体間での拒絶反応を調べる。

### 5. 代表的な研究成果

(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0件)

[学会発表] (計0件)