

機関番号：63801

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

研究成果の概要 (和文)：小型魚類であるゼブラフィッシュは、優れたモデル動物として盛んに用いられている。しかし、ゼブラフィッシュでは遺伝的背景が均一な近交系が作成されておらず、現在これが大きな欠点となっている。そこで本研究では、兄妹交配を繰り返すことによりゼブラフィッシュ近交系の作成を試みた。野生型 2 系統から兄妹交配を始めたところ、1 系統は 13 世代目にて絶えてしまったが、残る 1 系統にて近交系の定義である 20 世代の交配を達成した。

研究成果の概要 (英文)：Zebrafish is a small fresh water fish which is one of the excellent model animals, especially for the developmental biology. Yet, there is no inbred strain in zebrafish. Since the genetic homogeneity of inbred strain improves the precision of analyses, the lack of inbred strains is a big disadvantage for zebrafish. Here, I have tried to inbreed two zebrafish wild-type strains through full sib-pair mating. Though one strain was failed to be succeeded after 13<sup>th</sup> generation, the other strain has reached to breeding larvae of 20<sup>th</sup> generation, which fulfills the definition of inbred strains.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,500,000	0	1,500,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
年度			
総計	3,300,000	540,000	3,840,000

研究分野：発生遺伝学

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、遺伝学

## 1. 研究開始当初の背景

ゼブラフィッシュは特に発生学の分野でよく用いられている優れたモデル動物であり、実験発生的・分子生物学的手法に加え、世代時間が約3ヶ月と短く多産であるため遺伝学的手法をも適応できる。しかし、ゼブラフ

ィッシュには遺伝学を適応するモデル動物として一つの弱点がある。それは、未だに近交系が無いことである。近交系は兄妹交配を20世代以上繰り返すことにより遺伝的背景が均一となった集団であり、量的形質など複数の遺伝子に支配される形質の解析には必

須とも言える。メンデル形質の解析手法が確立された今、量的形質の遺伝学的解析が次なる課題となりつつある。従って、近交系の欠如は今後、より複雑な生命現象を解析する上で大きな欠点になることが予想された。

ゼブラフィッシュにて近交系が無い理由は研究者間で様々な憶測がなされているが、私が国内外の関係者に問い合わせたところ、はっきりした情報はないのが現状であった。オレゴン大学にて近交系の樹立が試みられているという噂は十年以上前からあるが、未だに完成したという報告はない。完成したという報告がないところを見ると、ニワトリの例のように近交退化が激しくゼブラフィッシュではそもそも近交系はできないのだろうという見解もある。一方で、最短でも5年という長い期間・労力がかかる仕事のため、誰も真剣に試みる人はいないのだという意見もあった。近交系樹立を試みた規模や研究者名など具体的な情報が無い現状では、「そもそも近交系は樹立できない動物である」との判断は早急である。しっかりとした体制を組み、十分な規模で樹立を試みて、その結果を発信することが重要だと考えた。

そこで私はゼブラフィッシュ近交系の樹立を目指し、野生型の兄妹交配を計画した。遺伝学的解析に用いることを想定して野生型2系統(Tübingen系統、India系統)から近交系を樹立することとした。本科学研究費補助金採択時まで、2つの系統それぞれを5世代目の稚魚の飼育まで順調に進めていた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は以下の2点である。

### (1) ゼブラフィッシュにおける近交退化の強さを見極める

ニワトリやウズラのように近交退化が強い場合には、近交系の樹立はそもそも困難である。ゼブラフィッシュにおいて近交退化がどの程度の強さであるのか、近交系の樹立が可能な程度であるのかを見極める。このため、既に近交系が樹立されているマウスやメダカの情報と比較して検討する。

### (2) ゼブラフィッシュ近交系を樹立する

(1)の結果、近交退化が強すぎるのでなければ、兄妹交配による初めてのゼブラフィッシュ近交系の作成を目指す。遺伝学的解析への利用を可能にするため、2系統の近交系樹立を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) 用いた系統

ゼブラフィッシュの代表的な野生型2系統よ

り、近交系の樹立を行った。1つは長く野生型系統として研究者の手により維持されてきたTübingen系統であり、ゼブラフィッシュゲノムプロジェクトによるゲノム配列決定の対象系統でもある。もう一つは比較的新しい飼育系統のIndia系統である。この系統はTübingen系統に対するマッピング用の系統として頻繁に用いられている。

### (2) 継代方法

上述した2つの目的を達成するため、それぞれの野生型系統にて兄妹交配を繰り返した。各世代5ペアを作成して採卵し、産卵数・受精率・死亡率・発生異常の有無のデータを取得した。さらに生育速度や性比の情報も含め、最も状態の良いペアの仔魚から次世代のペアを作成した(図1)。尚、飼育スペースの関係から、孫の代が問題なく産卵することを確認できた当該代の各ペアは処分(エタノール固定)を行った。仔魚の飼育途中に親ペアが死んでしまった場合にも、DNAを抽出できるよう、エタノールに保存した。

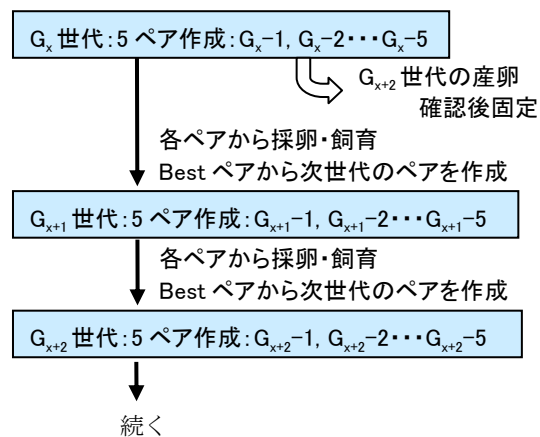


図1 継代方法の概要

### (3) 近交系化の確認

近交系化(ホモ化)が進む様子を観察し、かつ万が一コンタミネーションが起きていた場合には素早く事実を把握して対応するため、遺伝マーカーによるゲノムのモニタリングを行った。遺伝マーカーには、ZFIN ([http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?Mival=aa-ZDB\\_home.apg](http://zfin.org/cgi-bin/webdriver?Mival=aa-ZDB_home.apg))に記載されているSSLPマーカー(Simple Sequence Length Polymorphism)を用いた。1染色体あたり2マーカー、ゼブラフィッシュの染色体は25本あるので計50マーカーを選出した。選出の際には、Tübingen系統、India系統それぞれの継代開始ペア(0世代目の継代ペア)において多型が検出されたマーカーを可能な限り採用した。

移植実験等の解析に実質的な近交系として作成している系統が利用できることを確認するため、免疫拒絶反応の有無を調べた。

これには、背部の鱗を腹部へ移植する鱗移植技術を用いた。腹部の鱗にはメラニン色素はほとんど認められないが、背部の鱗には多数存在するため、腹部に移植された背部由来の鱗は容易に識別できる。移植後 24 日目まで経時的に観察を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) Tübingen 系統の近交系化

Tübingen 系統の近交系化系統を TM 系統 (Tübingen-Mishima 系統) と名付け、本研究課題採用後は 6 世代目以降の兄妹交配を行った。11 世代目までは、産卵数・受精率・死亡率共に世代毎に多少の変動はあるものの、0 世代目と大きな差は認められず比較的順調に継代できていた。しかし、12 世代目の数ペアから得たほとんどの胚にて、共通した特徴的な表現型が観察された (図 2)。TM phenotype と名付けたこの表現型では、頭部が小さく血流が悪かった (図 2C)。さらに、下顎も未発達で採餌できない (図 2D) こともあり、受精後 5-10 日にて表現型を呈した個体は全て死んでしまった。12 世代目からの胚の内、TM phenotype を示さなかった胚を飼育し、13 世代目ペアとして 7 ペアを作成したが、いずれのペアからもさらに重篤な TM phenotype を示す胚が生じた。11, 12 世代目にさかのぼって、別の親由来のペアを作成するなどの対策を行ったが、加齢や性比の偏りのために次世代を得ることができず、TM 系統は 13 世代目にて絶えてしまった。



図 2 TM phenotype

遺伝マーカーによるゲノムのモニタリングの結果、TM 系統は兄妹交配開始の 0 世代目にて 52% (26/50) のマーカーで多型が観察されていた。継代を重ねるに従い、9 世代目には 12% (6/50)、11 世代目には 8% (4/50) にまで多型を示すマーカーが減少していた。予期しない対立遺伝子が現れることもなく、順調に遺伝的背景の均一化が進んでいたことがわかった。

##### (2) India 系統の近交系化

India 系統の近交系化系統を IM 系統 (India-Mishima 系統) と名付け、本研究課題採用後に 6 世代目以降の兄妹交配を行った。継代を重ねても産卵数および死亡率には顕著な変化は認められなかった。一方、0 世代目当

初平均 90%以上だった受精率は、7-9 世代目付近には 40-50%にまで落ち込んだ。しかしその後、各世代にてなるべく受精率が高いペアを継代するよう選択を行った結果、徐々に回復の兆しが見え、15 世代目には 80%程度にまで上がった。

驚いたことに、14 世代目の 1 ペアから得た胚に TM phenotype が観察された。遺伝的背景が全く異なる野生型に由来する 2 つの系統にて共通の表現型が認められたことになる。幸い、他のペアは正常胚を生じたため、継代には問題がなかった。しかしその後も、16 世代目の 1 ペアからやはり TM phenotype 胚が生じており、注意が必要である。TM phenotype 胚を生じた場合には、その二世代前に戻って継代ペアを変更して継代をやり直した。また、念のため 16 世代目以降はペア数を増やして継代を行った。最近になり、国内外の別の研究室でも非常にクローズドな環境で飼育した場合に、TM phenotype とよく似た表現型が観察されているとの情報を得た。異なる環境、異なる遺伝的背景の元でも TM phenotype が観察されており、どのようなメカニズムによりこの表現型が生じるのか、非常に興味深い。TM phenotype は遺伝的多様性が失われてきたゼブラフィッシュに現れやすい表現型であると考えられる。ゼブラフィッシュの典型的な近交退化の表現型なのかもしれない。

TM phenotype が時折出現する以外には、おおむね順調に継代を行うことができた。現在 19 世代目のペアから採卵した稚魚を飼育中である。これらの稚魚は兄妹交配を 20 回繰り返しており、すなわち近交系の定義を満たす魚である。従って、目的の 1 つであった近交系の樹立を達成することができた。若干小型化しており、成熟にもやや時間を要するようになってきているが、ゼブラフィッシュにおいても丁寧な選択をかけることにより、近交系の樹立が可能であることを示せた。メダカでは各世代 2 ペアのみによる選択で、ほとんどの場合に近交系の樹立に成功すると聞いている。一方のマウスでは 8 世代目付近までは継代がかなり難しく、1 つの近交系を樹立するために相当数のペアを並行して飼育する必要があるという。ゼブラフィッシュでは各世代基本的には 5 ペア、16 世代目以降は 10 ペア程度での選択を行い、2 系統の内 1 系統で近交系樹立に成功した。これらのことから、ゼブラフィッシュの近交退化はメダカよりも明らかに強く、マウスに近いと思われる。従って、ある程度の労力・コストを要するが、ゼブラフィッシュにおいても今後複数の近交系を樹立することは可能だと考えている。

遺伝的モニタリングにより、0 世代目では 84% (42/50) のマーカーで多型が認めら

れていたが、9 世代目では 8% (4/50) に減少し、13 世代目以降は 1 マーカーのみ多型が観察された。現在 17 世代目まで調べているが、13 世代目以降と同じ結果であった。コンタミネーションもなく、遺伝的背景が高度に均一であることが示された。

さらに、鱗移植により系統内での免疫拒絶反応の有無を調べた。自家移植では拒絶反応が起きず、移植後 24 日たってもほとんどの鱗が移植された場所にて維持される (図 3 点線: auto)。これに対し、遺伝的背景が多様な野生型 India 系統にて他家移植を行った場合には、日が経つにつれ鱗が拒絶されて失われ、移植後 24 日には残っている鱗はほとんど無かった (図 3 実線: diff)。

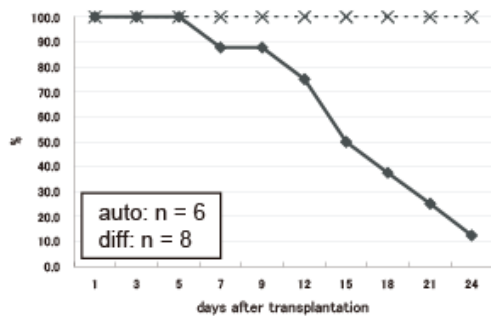


図 3 India 系統における鱗移植

IM 系統にて移植を行った場合には、14 世代目で既に自家移植の場合と有意差のない結果であった。また、16 世代目には自家移植と全く同じように移植後 24 日目にも全ての鱗が残っていた (図 4)。

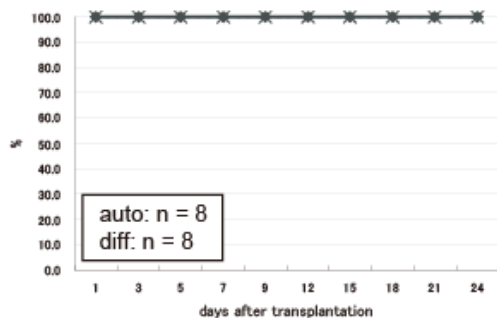


図 4 IM 系統 (16 世代目) における鱗移植

以上の結果から、IM 系統内での成体間移植が可能であることが示された。マウスやラットではガン組織の移植実験に近交系が用いられ、遺伝的背景が均一であることの威力が発揮されている。近年、ゼブラフィッシュもガン研究のモデル動物として利用されつつあり、IM 系統の存在は大きな利点となるものと期待される。

### (3) まとめ

本研究課題ではゼブラフィッシュの野生型 2

系統から兄妹交配を始め、内 1 系統の IM 系統にて近交系の樹立に成功した。ゼブラフィッシュで初めての近交系を樹立し、樹立が可能であることを示すことができた。遺伝学的解析には複数の近交系が必要であることから、本結果を受け、より多くの研究者が真剣にゼブラフィッシュ近交系の作出を手がけ、より多くの近交系が樹立されることを期待する。また、この継代を通じ、ゼブラフィッシュの近交虚弱はメダカよりは強いが、ニワトリやウズラよりも遙かに弱く、マウス程度であることが明らかとなった。従って、マウスと同程度の労力を費やせば、今後多数のゼブラフィッシュ近交系が樹立できるはずである。

尚、本研究の成果は公表するべく、現在論文執筆中である。

## 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 1 件)

- ① Kawasaki, T., Saito, K., Shinya, M., Olsen, L. C., Sakai, N. Regeneration of spermatogenesis and production of functional sperm by grafting of testicular cell aggregates in zebrafish. *Biology of Reproduction*, 83: 533-539, 2010. <査読有>

[学会発表] (計 2 件)

- ① Shinya, M., Sakai, N. Trials for establishment of zebrafish inbred strains. 第 16 回小型魚類研究会、2010 年 9 月 18~19 日、埼玉
- ② Shinya, M., Sakai, N. Trials for establishment of zebrafish inbred strains. 9<sup>th</sup> International Zebrafish Genetics and Development Meeting. 2010 年 6 月 16~20 日、Madison, Wisconsin, USA

## 6. 研究組織

### (1) 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