

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770063

研究課題名(和文) 臀鰭におけるパターン形成機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of a pattern formation mechanism in an anal fin

研究代表者

木村 哲晃 (Kimura, Tetsuaki)

基礎生物学研究所・IBBPセンター・特任助教

研究者番号：60465250

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：Hd-rR111系統を用いて薬剤処理により脊椎融合症を人為的に誘導し体長を短くする実験を行った。その結果、臀鰭の前後軸長が短くなるに伴い臀鰭鰭条数が減少した。また、付加直後にメダカを26度で飼育するグループと17度で飼育するグループとに分けて飼育した。その結果、17度飼育した場合には臀鰭鰭条数が増加しており、鰭条同士の間隔も狭くなっていた。

fs変異体は騎乗のパターンが乱れる変異体である。このfs変異体の原因遺伝子を同定するために96個体(変異体48個体、同腹子の野生型48個体)を使った連鎖解析を行い、fs変異体の原因遺伝子が3番染色体上にあることを初めて明らかにした。

研究成果の概要(英文)：I crossed an inbred line of Hd-rR111 and Kaga. I found that The variation of number of anal fin rays correlate with anteroposterior length of anal fin and interval between anal fin rays on F2 fish. Phenylthiourea treatment induced a nonheritable, shortened body length by vertebral fusion resulting from a twisted notochord, and decreased the number of anal fin rays. Hd-rR111 fry were reared at two different temperatures, 26°C and 17°C after hatching. The interval between anal fin rays became narrower in the 17°C batch and, as a result, the mean number of anal fin rays increased. These experiments suggested that the number of anal fin rays was determined by the anteroposterior length of the anal fin and the intervals between rays.

fs mutant has an abnormal pattern of fin rays. I assigned the fs locus to chromosome 3 by bulk segregation analysis.

研究分野：遺伝学

キーワード：形態形成 ポジショナルクローニング

1. 研究開始当初の背景

担鰭骨は軟骨を芯にして周りにカルシウムが沈着して出来る硬骨であり、軟骨のパターンを硬骨が引き継ぐという点で四足動物の手足の骨のパターン形成に関するモデルとなり得る。手足の骨のパターンは複雑であるが、担鰭骨原基の軟骨パターンは二次元の縞模様として近似できる。この予定臀鰭領域に形成される縞模様(軟骨の位置)がどのような分子により、どのような機構で決定されるかが容易に理解できると期待される。発生過程においては同じ分子が様々な局面で繰り返し利用されていることから、この分子機構の解明は肢芽の様なより複雑な軟骨パターン形成の理解に大きく寄与できると期待される。

2. 研究の目的

担鰭骨は軟骨を芯とした硬骨であり、軟骨のパターンを硬骨が引き継ぐという点で四足動物の手足の骨のパターン形成に関するモデルとなり得る。手足の骨のパターンは複雑であるが、担鰭骨原基の軟骨パターンは二次元の縞模様として近似できるより単純なものである。本研究では臀鰭鰭条間隔の多型に関わる遺伝子群を同定し、均一な細胞群からいかにして臀鰭鰭条の繰り返し構造ができるのかを分子レベルで解明することにより生物における骨のパターン形成機構の理解を目指す。

3. 研究の方法

臀鰭担鰭骨原基の軟骨パターン形成機構の理解を目指し、(1)近交系統 Hd-rRII1 及び Kaga の間の鰭条間隔多型に関する原因遺伝子の同定、(2)鰭条間隔の変異体 fs の原因遺伝子の同定により鰭条間隔に対する影響を調べる。仮説として Turing 波により軟骨の形成パターンが決定されると仮定しているため、先の方法で特定された遺伝子もしくはそれらに関わるカスケードの遺伝子の発現パターンなどにより Turing 波を実際に観察し、それらが摂動により変化することそして鰭条パターンが変化するか否かを確認する。(3)モルフォジェンの候補遺伝子産物を染み込ませたビーズ移植による軟骨の形成パターンに関わる遺伝子経路の同定

(1)に関しては、これまでに同定した2つの QTL 領域をスピードコンジェニック作成法により狭い領域へと絞り込む。最終的に10から20の遺伝子を含む領域にまで狭めることを目標にする。

(2) fs 変異体 1000 個体を目標に収集し、遺伝学的に原因遺伝子を同定する。こ

れまでに作成されたメダカの連鎖地図は1,500cMほどであり、ゲノムサイズはおおよそ800Mbpであるため、これで0.1cM約5kbpの範囲に絞り込める。メダカのESTライブラリーの平均差長は2kbp程度なので、これにより候補を2から3遺伝子には絞り込めると期待できる。

(3)何らかのモルフォジェンが Turing 波の実態である可能性を探るため、ビーズ移植の実験を行う。担鰭骨形成は予定臀鰭領域のやや前方から始まるため、後方に Turing 波の実態分子強い入力があるとそこから異所的な担鰭骨形成が始まると予想される。これが起こるかどうかを指標にビーズ移植によるスクリーニングを行う。異所的な形成もしくは鰭条間隔に変化が見られモルフォジェンを同定できた場合は、その阻害剤中での飼育及び過剰発現のためのトランスジェニックライン(TG ライン)を作成する。

4. 研究成果

これまでに異なる地域集団に由来する近郊系 Hd-rRII1 および Kaga 系統の掛け合わせとその子孫の形態観察から、臀鰭鰭条の本数は臀鰭の前後軸長および鰭条同士の間隔という異なる二つの形質により規定されている可能性を見出した。

まず、臀鰭前後軸長の影響を確認するために、Hd-rRII1 系統を用いてフェニルチオ尿素処理により脊椎融合症を人為的に誘導し体長を短くする実験を行った。胎胚期の卵をフェニルチオ尿素を含む溶液中で48時間培養し、その後飼育水に置換して孵化まで26度で飼育した。フェニチオ尿素溶液中においても体節の形成は正常に起こり、コントロールの同輩と比較しても異常は見られなかった(図1A、B)。しかし、3日を過ぎた頃より処

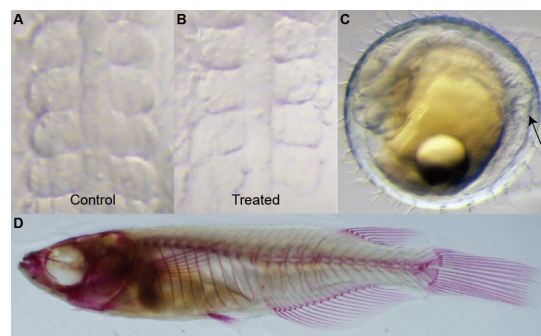


図1 フェニルチオ尿素処理

理胚において脊索の湾曲が見られるようになる(図1C)。処理胚はその後成熟し、任性を持ったメダカになるが、椎骨の融合が観察され体長が短くなる(図1D)。椎骨から伸びる神経棘の数を数えたところ、非処理メダカでは平均29個の椎体を持ち(n=34)、処理メダカでも平均29個の椎体を持っていた(n=18)。ウェルチの t 検定を行ったところ、

有意差はなかった。しかし、臀鰭の鰭条数に関しては非処理メダカにおいて平均が 19 本であったのに対して、処理メダカでは 17 本であった。ウェルチの t 検定を行ったところ、臀鰭の鰭条数は有意差が認められた。よって、臀鰭の前後軸長が短くなるに伴い臀鰭鰭条数が統計的に有意に減少することを確認した。同時に、椎体の数と鰭条数が独立であることから、臀鰭鰭条のパターンは体節や椎骨のパターンから独立したものであることが示された。

次に、鰭条同士の間隔が鰭条の本数に与える影響を確認するために臀鰭発生中の温度の影響を調べた。椎骨の長さを揃えるために、近郊系統の Hd-rRII1 を孵化まで同じ温度で発生させ、孵化直後に通常温度(26 度)で飼育するグループ(対象実験群)と低温(17 度)で飼育するグループ(低温飼育群)とに分けて 4 ヶ月間飼育した。その結果、低温飼育群は対象実験群よりも有意に臀鰭鰭条数が増加しており、また、鰭条同士の間隔も統計的に有意な差を持って狭くなっていた(図 2)。これらのことから、臀鰭の鰭条数は“臀鰭の基部の前後軸長”及び“鰭条同士の間隔”という二つの異なる遺伝形質から決定されるということが明らかになった。

これまで臀鰭の鰭条数は本数自体が量的形質として扱うのが普通であった。今回新しく臀鰭の鰭条数は“臀鰭の基部の前後軸長”及び“鰭条同士の間隔”という二つの形質に別れることが明らかになったため、本数を形質にして量的形質座位(QTL)の解析を行った場合と、二つの形質に分けて QTL の解析を行

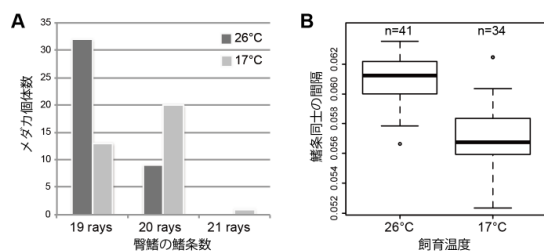


図 2 低温処理

った場合とで検出される QTL にどのような変化があるか否かを解析することにした。

魚類は死ぬまで成長するため、臀鰭の前後軸長及び鰭条同士の間隔は体長との比をとって形質とした。掛け合わせには Hd-rRII1 と Kaga 系統を使った。Hd-rRII1 系統は平均で 19 本の臀鰭鰭条を持っていた。一方、Kaga 系統は平均で 15 本の臀鰭鰭条を持っていた。これらの 2 系統の掛け合わせから得られた F₁ 世代は平均で 19 本の臀鰭鰭条を持っていた。F₁ の兄妹交配で得られた F₂ 世代は平均で 18 本の臀鰭鰭条を持っていたが、その分布は 15 本から 23 本に及び Kaga 系統から Hd-rRII1 を超える範囲に及んでいた。

形質の正規性を検定した結果、本数は正規

分布ではなかったのでノンパラメトリクな検定を行った。その結果、18 番染色体と 20 番染色体に QTL を検出した。比較のため、臀鰭の前後軸長と鰭条同士の間隔に関してもノンパラメトリクな解析を行った(図 3)。

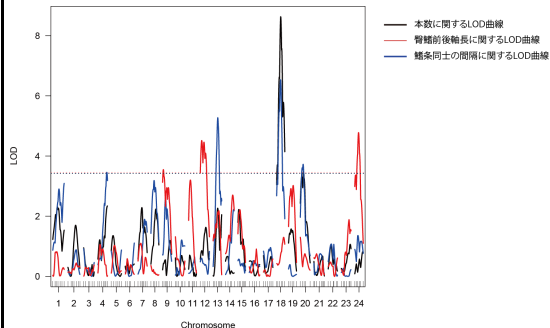


図 3 LOD 曲線の比較

臀鰭の前後軸長に関しては 9 番染色体、12 番染色体、24 番染色体の 3 箇所に QTL を検出した。鰭条同士の間隔に関しては 4 番染色体、13 番染色体、18 番染色体、20 番染色体に QTL を検出した。18 番染色体と 20 番染色体の LOD 曲線は本数の LOD 曲線によく似ており、同じ領域を検出していた。これらの結果から、Hd-rRII1 系統と Kaga 系統の臀鰭鰭条数の差異は鰭条同士の間隔が大きな要因になっていることが示唆された。また、鰭条同士の間隔で解析したほうが多くの QTL を検出できた。このうち 18 番染色体と 20 番染色体に関してコンソミック系統を作成中である。

メダカにはこれまで集められてきた変異体が数多く存在し、その中には臀鰭の鰭条に関する変異体も存在する。fs 変異体は背鰭と臀鰭を裏打ちする担鰭骨が基底部分で融合してしまう変異体で、背鰭と臀鰭が前後軸方向に短くなっている。担鰭骨のパターンはそのまま鰭の鰭条に受け継がれるため、結果とし

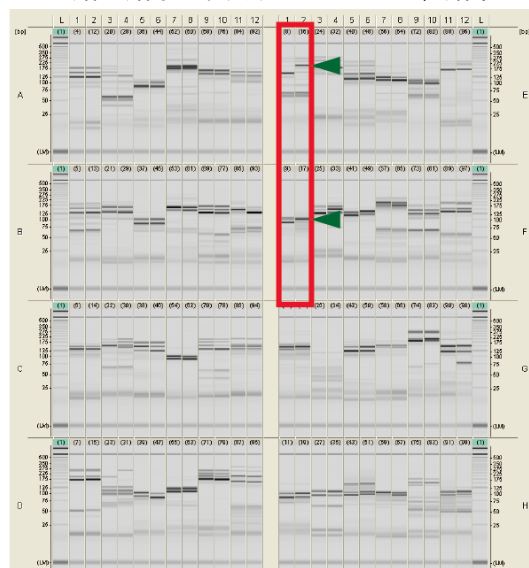


図 4 fs 変異体のバクルセグレーション解析の結果

赤い四角で囲んだ 3 番染色体のマーカーで右のレーンにおいて fs 変異体由来のバンドが増えている(緑の矢頭)。このことから fs 変異体の原因遺伝子が 3 番染色体上にあることがわかる。

て鰭条のパターンも乱れる。この fs 変異体の原因遺伝子を同定するために 96 個体（変異体 48 個体、同腹子の野生型 48 個体）を使ったバルクセグレーション解析を行い、fs 変異体の原因遺伝子が 3 番染色体上にあることを初めて明らかにした（図 4）。その後、個体数を増やして行った解析で 3 番染色体の 4 メガベースの範囲に候補領域を絞り込んでいる。この領域には FGF シグナルや BMP シグナルに関わる幾つかの遺伝子が含まれており、今後原因遺伝子を同定することでどのようなシグナル経路が机上のパターン形成に関わるか、最終的にはそこに関係するモルフォジェンの正体を明らかにできると考えている。

モルフォジェンとなりそうな遺伝子産物のビーズ移植を行った。しかし、孵化直後の稚魚の尻尾の担鰭骨が形成される領域にはあまり空間がなく、ビーズをうまく固定することができなかった。結果として、予定臀鰭領域にビーズを移植することによるモルフォジェンの探索はできなかった。

今回の結果から臀鰭の鰭条数は臀鰭の前後軸長と鰭条同士の間隔から決定されることが明らかになった。今後は fs 変異体の原因遺伝子を同定することで、鰭条同士の間隔に関わる因子を同定できると予想される。これにより、脊椎動物の形態形成機構に関する知見を積み上げることができると思われる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

動物学会 第 84 回 岡山大会、メダカの臀鰭鰭条数の変異に関する研究、木村哲晃、2013 年 9 月 27 日、岡山大学、岡山県、岡山市

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木村 哲晃 (Kimura, Tetsuaki)