

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 1 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670144

研究課題名(和文)デメキンモデルとした眼球サイズを制御するメカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms underlying eye size regulation using Demekin, telescopic-eye goldfish

研究代表者

大森 義裕 (Omori, Yoshihiro)

大阪大学・たんぱく質研究所・准教授

研究者番号：90469651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脊椎動物において、体の大きさに対する眼球のサイズには種によって多様性があるが、それぞれの種においては限定されている。眼球サイズの異常は、ヒトでは小眼球症や牛眼といった重篤な先天性異常や、近視・遠視の発症と深く関連するが、その分子メカニズムの全体像は明らかでない。キンギョは、デメキンやワキン、リュウキンなど多くの品種が作出されている。これらの品種は、遺伝的な形質をもつ「変異体」であり、交配することができ原因遺伝子の同定を進めることが原理的に可能である。私たちは、眼球サイズに異常をもつデメキンに注目し眼球サイズの制御メカニズムの解明を行った。

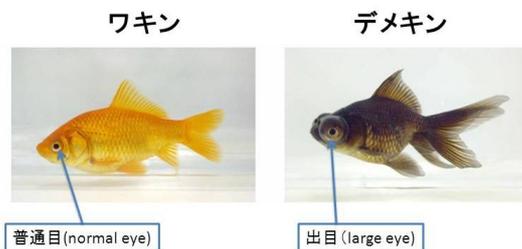
研究成果の概要(英文)： Among vertebrates, the size of the eyeball displays a wide range of variation with respect to the body proportion within species. Because subtle changes in eyeball size can affect the focus and visual acuity, our work will focus on eye size controlling factors using goldfish. Goldfish (*Carassius auratus*) belongs to the family Cyprinidae. Demekin (also called “black moor” or “telescopic-eye” goldfish) is a mutant strain of the common goldfish. A morphological feature of Demekin goldfish is an enlargement of eyeballs. However, little is known about the molecular mechanisms controlling their specific eye morphology. To gain a deeper understanding on the factors controlling eye size, we are aiming to identify and analyze a responsible gene for the Demekin strain. Further identification of the genetic framework will establish goldfish as a new tool of research for elucidating the molecular basis underlying the developmental and morphological features of vertebrates.

研究分野：発生生物学

キーワード：デメキン キンギョ 魚類 ゲノム解読 眼球

1. 研究開始当初の背景

脊椎動物において、体の大きさに対する眼球のサイズには多様性があり、それぞれの種で決定されている。眼球サイズの異常は、ヒトでは小眼球症や牛眼といった重篤な先天性異常や近視や遠視の発症と深く関連するが、その分子メカニズムの全体像は明らかでない。私たちは、小型魚類モデルであるゼブラフィッシュを用いて、眼の発生にかかわる遺伝子群を解析してきた (Omori et al., *Current Biol* 2006, 16, 945, Omori et al., *Nat Cell Biol* 2008, 10, 444, Zhao, Omori et al., *PNAS* 2012, 109, 2388)。これらの研究を進める中で、私は、眼球サイズに異常をもつデメキンに注目した。キンギョは、約 500 年前より日本において飼育され、デメキンやワキン (下図)、リュウキンなど多くの品種が作出されている。これらの品種は、遺伝的な形質をもつ「変異体」であり、交配することができ、原因遺伝子の同定を進めることが原理的に可能である。



2. 研究の目的

小型魚類のモデル生物としては、メダカとゼブラフィッシュが確立されており、1990 年代より数多くの研究が進められてきた。メダカとゼブラフィッシュは、繁殖が容易であり世代時間が短い (約 3 か月) という特徴を持つ。一方で、メダカとゼブラフィッシュは、個体サイズが小さいため、神経系の手術が必要な研究や、生理活性物質や蛋白質の精製など大量のサンプルを必要とする研究には不向きである。キンギョはゼブラフィッシュと同じコイ科の硬骨魚類であるが、神経電気生理の研究をはじめ、多くの研究で使われてきた。しかし、世代時間が比較的長く (2~3 年) 遺伝学的な研究をすすめることはこれまで難しかった。一方で、キンギョには、デメキンをはじめ、リュウキン (尾ひれの長さの変異、骨形成変異)、チョウテンガン (眼球の向きの変異)、ランチュウ (背びれの変異、顔面こぶの形成)、スイホウガン (眼下の水泡形成) といった多くのバリエーションを持つ品種 (遺伝的な「変異体」) が開発されており、これらは互いに交配可能である。これ

らの変異体は、眼球サイズの変異や、尾の形態の変異、骨形成の変異、皮膚の形態の変異など、様々な形態に影響を与える遺伝子変異が含まれていると予想される。雑種交配とその子孫のゲノム解析により、遺伝子変異を見出すことで原因遺伝子を特定することが可能であると考えられる。ゼブラフィッシュやメダカの変異体の研究は発生期での変異がほとんどであり、多くのものが致死性で、成魚の形態変化については、ほとんど研究されてこなかった。これは、成魚の解析に時間とスペースが必要であることも大きな要因だと思われる。これに対し、キンギョの変異体はすべてが、成魚にまで成長し繁殖可能な変異であり、ゼブラフィッシュやメダカの解析からは得られなかった脊椎動物の発生や形態形成に関して、新たな知見が得られることが期待される。

キンギョの遺伝学的な研究としては、キンギョのミトコンドリア DNA の解析から、キンギョがギベリオブナ (*Carassius gibelio*, 中国産のフナ) に由来するものであり、現在流通している 17 品種のキンギョが 5 つのグループに分かれることを明らかにしている (文献)。しかし、ゲノム情報に関しては、これまでほとんど研究されていない。

水産業においても、キンギョは重要な種である。観賞魚の市場においてキンギョは重要な位置を占めている。愛知県の弥富市や奈良県大和郡山市では、伝統的にキンギョの生産が盛んであり、伝統産業としての側面を持つ。キンギョは変異種の掛け合わせを繰り返すことでしか系統を維持できないため、ウイルスや病原菌に弱くキンギョ育成業者にとって最大の懸案事項のひとつとなっている。ニジマスにおいては、ゲノム解析から、ウイルス耐性に関する遺伝子をニジマスから同定した例がある (文献)。キンギョゲノムが解読されれば、キンギョのウイルス耐性をはじめとした、耐病性形質識別マーカーの同定が容易になると考えられる。

本研究では、デメキンを用いて眼球サイズの制御因子を同定することで、小眼球症や牛眼、近視や遠視をはじめとした眼球サイズ異常にかかわる疾患の発症メカニズムの解明に繋がる可能性が期待される。同時に、変異体の宝庫であるキンギョをモデル生物として確立すべく、ゲノム情報の整備に取り組むことで、将来的には形態形成に関連する遺伝子群をキンギョの品種から同定する。近年、iPS 細胞や ES 細胞を用いた再生研究が眼の分野では、特に盛んに行われている。眼球のサイズを適切に保つことは、移植組織を作製するうえで重要であると考えられる。再生医療の分野にも本研究から得られた知見が役立つ可能性が考えられる。

3. 研究の方法

次世代シーケンス解析に用いる高分子量ゲノム DNA の精製については以下の方法により行った。ワキンの筋肉組織 1g をメスで切り出し、液体窒素により凍結する。Tissue LyserII (Qiagen) とジルコニアボールを用いて組織を破碎する。Qiagen-tip に付属の G2 溶液を 19ml (RNase 40 μ l 入り) と Proteinase K 1ml を加え 50 $^{\circ}$ C 2 時間 Lysis 反応を行う。この時、ヴォルテックスによる攪拌は避ける。Lysis 溶液を QBT 処理の終わった Genomic-tip500/G にアプライする。カラムを QC 溶液 15ml で 2 回洗浄した後、QF 溶液 15ml で DNA を溶出する。10.5ml のイソプロパノールを加え 5000xG で 15 分遠心することで沈殿を得る。得られた DNA は濃度を測定し (Molecular Device)、電気泳動により分子量を測定する。

4. 研究成果

デメキンの出目形質原因遺伝子の同定には、異系交配が必要である。野生型としては出目形質を持たない野生型としてワキンを用いた。まず、はじめにデメキンとワキンの交配をおこなった (愛知県水産試験場・弥富指導所と共同研究)。デメキンとワキンを掛け合わせた第一世代 (F1) は、出目形質を全く示さず、この形質が単一原因遺伝子による劣勢遺伝形質である可能性が示唆された。出目形質とは異なるが、デメキンの尾は二股に分かれた尾びれを形成する。この形質を三ツ尾と呼ぶ。一方、ワキンではフナ尾と呼ばれる野生のフナやコイのような形態のヒレを持つ。F1 世代では、三ツ尾となる個体も見られなかったことから三ツ尾形質は劣勢遺伝すると考えられる。この F1 を 2 年かけて育成し繁殖可能な状態にまで成長させることができた。次に F1 世代の個体とデメキンの戻し交配を行い第 2 世代 (F2) を得た。F2 は、出目形質が約半数の個体に見られ、これらの形質が単一原因遺伝子による劣勢遺伝を示すことが明らかとなった。

また、三ツ尾を示す個体も約半数見られ三ツ尾形質も劣勢遺伝することが明らかとなった。最近、リュウキンを用いた研究により三ツ尾形質が劣性遺伝することが示されている。この報告ではリュウキンなどの三ツ尾を持つキンギョの遺伝学的解析から Dorsal-Ventral パターンを制御する chordin A の変異が原因となっていることを明らかとしている (文献)。三ツ尾形質が劣性遺伝することは、この報告と一致する結果となった。

またデメキンの発生段階における眼球形成について解析を行った。デメキン同士から得られた受精卵とワキン同士の掛け合わせから得られた受精卵をそれぞれ観察した。眼球の大きさは受精後 1 か月程度までは野生型であるワキンと変化がなく、2 か月頃から徐々に眼球の拡大が見られた。

F2 の稚魚約 1500 匹の組織サンプルを採取し -80 $^{\circ}$ C 保存を行った。これらのゲノムを採取した。出目形質の原因遺伝子座では出目形質をもつ F2 でホモとなり、F1 と出目形質をもたない F2 個体でヘテロとなると考えられる。

次世代シーケンサーによるゲノム解析のための高分子量 DNA の精製に関しては、電気泳動により分子量を測定したところ 40kbp 以上の高分子量のゲノム DNA が精製されていることを確認した。

最近、キンギョと近縁であるコイのゲノムが解読された (文献)。コイのゲノムサイズは 1.83Gb と推定された。これは同じコイ科のゼブラフィッシュとほぼ同程度のゲノムサイズであり、ゲノムサイズが 3.0Gb であるヒトと比較するとコンパクトである。しかし、タンパク質をコードする遺伝子の数は 52,610 とゼブラフィッシュを含む一般的な硬骨魚類や哺乳類の約 2 倍存在することが明らかとなった。コイやキンギョでは染色体数が $2n=100$ 前後であることが知られており、これはゼブラフィッシュ $2n=50$ の約 2 倍であることと一致する。進化的にコイの祖先種において全ゲノム重複が起きたことによると考えられる。コイと極めて近縁であるキンギョにおいても同様のことが起こっている可能性が高い。このことはパラログが一般の脊椎動物と比べて 2 倍存在することを意味している。ゲノム解読を進める場合、ホモロジーの高い遺伝子がパラログであるのか、同じ遺伝子の別アレルであるのかの区別が難しいことがあり、キンギョで全ゲノム重複が起こっているとするとキンギョ全ゲノム解読を進めるにあたって注意すべき点となることが予想される。

引用文献

An evolutionary origin and selection process of goldfish.
Komiya T1, Kobayashi H, Tateno Y, Inoko H, Gojobori T, Ikeo K.
Gene. 2009;430(1-2):5-11.

Quantitative trait loci (QTLs) associated with resistance/susceptibility to infectious pancreatic necrosis virus (IPNV) in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*).

Ozaki A1, Sakamoto T, Khoo S, Nakamura K, Coimbra MR, Akutsu T, Okamoto N. Mol Genet Genomics. 2001;265(1):23-31.

The origin of the bifurcated axial skeletal system in the twin-tail goldfish. Abe G, Lee SH, Chang M, Liu SC, Tsai HY, Ota KG. Nat Commun. 2014 Feb 25;5:3360.

The draft genome of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) provides insights into its evolution and vegetarian adaptation.

Wang Y, Lu Y, Zhang Y, Ning Z, Li Y, Zhao Q, Lu H, Huang R, Xia X, Feng Q, Liang X, Liu K, Zhang L, Lu T, Huang T, Fan D, Weng Q, Zhu C, Lu Y, Li W, Wen Z, Zhou C, Tian Q, Kang X, Shi M, Zhang W, Jang S, Du F, He S, Liao L, Li Y, Gui B, He H, Ning Z, Yang C, He L, Luo L, Yang R, Luo Q, Liu X, Li S, Huang W, Xiao L, Lin H, Han B, Zhu Z.

Nat Genet. 2015 Jun;47(6):625-31

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. 渡邊哲史, 大森義裕, 古川貴久. 網膜の発生研究と再生医療への応用. 生体の科学. 査読無, 2014, 65, 220-225. doi: <http://dx.doi.org/10.11477/mf.2425101612>

〔学会発表〕(計 4 件)

1. 大森義裕, 古川貴久. ゼブラフィッシュを用いた眼疾患・基礎研究のためのスキルとストラテジー. 第120回日本眼科学会総会, 2016年4月8日, 仙台国際センター(宮城県仙台市)
2. Meriam Boubakri, Tomoki Sawada, Takaharu Matsumura, Takahisa Furukawa, Yoshihiro Omori. Genetic analysis of Demekin, a goldfish mutant strain defective in eye size regulation. 第38回日本分子生物学会, 2015年12月2日, 神戸国際展示場(兵庫県神戸市)
3. Meriam Boubakri, Hiromi Hirata, Takahisa Furukawa, Yoshihiro Omori. A retrograde IFT complex component, ift122 is essential for ciliogenesis of sensory organs in zebrafish. 第21回小型魚類研究会, 2015年9月19日, 大阪大学銀杏会館(大阪府吹田市)
4. 大森義裕. 繊毛キナーゼによる繊毛内輸送システムの制御と繊毛関連疾患の

発症メカニズム. 第119回日本解剖学会総会・全国学術集会, 2014年3月28日, 自治医科大学(栃木県下野市)

〔図書〕(計 1 件)

1. Omori Y, Furukawa T. Springer Japan, Vertebrate Photoreceptors: Functional Molecular Bases : Chapter 8 " Structure and Development of the Photoreceptor Ribbon Synapse. ", 2014, 99-216.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況(計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等
<http://yoshihiroomori.web.fc2.com/>
http://www.protein.osaka-u.ac.jp/furukawa_lab/index.html

6. 研究組織

- (1)研究代表者
大森 義裕 (Yoshihiro Omori)
大阪大学蛋白質研究所 准教授
研究者番号 : 90469651

(2)研究分担者
()

研究者番号 :

(3)連携研究者
()

研究者番号 :