慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	メダカ頭蓋顔面形態の多様性 : 個体差を担う遺伝子を探す
Sub Title	Variations in the medaka craniofacial morphology : searching for the responsible genes
Author	新屋, みのり(Shinya, Minori) 成瀬, 清(Naruse, Kiyoshi)
Publisher	
Publication year	2017
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2016.)
JaLC DOI	
Abstract	頭蓋顔面形態は多様性に富む興味深い形質であり, その形成には環境と遺伝要因の両方が関わるとされている。我々は頭蓋顔面形態の多様性形成に関わる遺伝子の同定を目指し, メダカを用いた統計遺伝学的解析を実施した。その結果, 形質とゲノム領域との関連を複数見出し, 形質L33の関連ゲノム領域を6番染色体の約5Mbpに絞り込むことに成功した。また, 形質D29に対する二つの関連ゲノム領域の検証を進めたが, いずれも陰性であった。もう一つの形質V13では, 形質自体が環境の影響を受けやすく不安定であることが判明し, 解析不能との判断を下した。今後まもなくL33の絞り込みが完了し, 遺伝子の同定へと進める予定である。 Craniofacial morphology is a complex but interesting trait with high variety within a species while maintaining the particular morphology of the species. Logical questions have been posed in order to address variations in cranial morphology, such as how these traits are inherited, which genes regulate the diversity, and how differences between individuals within a species are generated during developmental or life processes. To answer these questions, we had performed quantitative trait loci (QTL) analyses using medaka. QTL analysis suggested the relationships between L33 and chromosome (chr) 6, D29 and chr 15, D29 and chr 22, and V13 and chr 5. Narrowing analysis using congenic strains revealed that about 5 Mbp region of chr 6 affects to L33. On the other hand, D29 were failed to be confirmed the relationships with both chr 15 and 22. V13 was turned out to be too unstable to analyze further.
Notes	研究種目 : 基盤研究(C)(一般) 研究期間 : 2014 ~ 2016 課題番号 : 26440191 研究分野 : 発生遺伝学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_26440191seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成　２９　年　　５　月　２４　日現在

機関番号：　３２６１２
研究種目：　基盤研究(C)（一般）
研究期間：　2014～2016
課題番号：　２６４４０１９１

研究課題名（和文）メダカ頭蓋顔面形態の多様性～個体差を担う遺伝子を探す～

研究課題名（英文）Variations in the medaka craniofacial morphology : searching for the responsible genes

研究代表者

新屋　みのり（SHINYA, Minori）

慶應義塾大学・商学部（日吉）・准教授

研究者番号：００３７２９４６

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　3,900,000円

研究成果の概要（和文）：頭蓋顔面形態は多様性に富む興味深い形質であり、その形成には環境と遺伝要因の両方が関わるとされている。我々は頭蓋顔面形態の多様性形成に関わる遺伝子の同定を目指し、メダカを用いた統計遺伝学的解析を実施した。その結果、形質とゲノム領域との関連を複数見出し、形質L33の関連ゲノム領域を6番染色体の約5Mbpに絞り込むことに成功した。また、形質D29に対する二つの関連ゲノム領域の検証を進めたが、いずれも陰性であった。もう一つの形質V13では、形質自体が環境の影響を受けやすく不安定であることが判明し、解析不能との判断を下した。今後まもなくL33の絞り込みが完了し、遺伝子の同定へと進める予定である。

研究成果の概要（英文）：Craniofacial morphology is a complex but interesting trait with high variety within a species while maintaining the particular morphology of the species. Logical questions have been posed in order to address variations in cranial morphology, such as how these traits are inherited, which genes regulate the diversity, and how differences between individuals within a species are generated during developmental or life processes. To answer these questions, we had performed quantitative trait loci (QTL) analyses using medaka. QTL analysis suggested the relationships between L33 and chromosome (chr) 6, D29 and chr 15, D29 and chr 22, and V13 and chr 5. Narrowing analysis using congenic strains revealed that about 5 Mbp region of chr 6 affects to L33. On the other hand, D29 were failed to be confirmed the relationships with both chr 15 and 22. V13 was turned out to be too unstable to analyze further.

研究分野：　発生遺伝学

キーワード：　量的形質　QTL　頭蓋顔面形態　メダカ　統計遺伝学的解析

１．研究開始当初の背景

頭蓋顔面には脳が収められている上に、眼や口・耳など個体の生存と密接に関連した重要な構造が含まれている。このためか、頭蓋顔面は個々の生物の生活環境に適応した形になっており、進化を考える上で重要な形質だと言える。しかも、頭蓋顔面形態は種特異性と同時に個体識別が可能なほどの種内多様性も併せ持っており、非常に興味深い。しかし一方で、その多様性の形成には複数の遺伝要因に加えて環境要因まで関わると考えられ、頭蓋顔面形態の種内多様性形成機構の解明は遅れているのが現状であった。

ところが近年、解析技術等の開発が進み、多因子を扱う必要がある複雑な現象への取り組みが試みられるようになってきた。そこで我々は、逸早く頭蓋顔面の形態形成機構の研究に着手し、その遺伝的基盤の解明を目指している。

最初に、形態の多様性に関連するゲノム領域を同定する手法の一つである量的形質遺伝子座解析（QTL 解析）を行った（引用文献①）。材料には、QTL 解析に適した小型魚類であるメダカを用い、遺伝的に離れた関係にある二つの近交系（Hd-rR, HNI）を解析家系とした。この解析を通じ、3 つの頭蓋顔面形質に関わる 4 つのゲノム領域を見出すのに成功している。見出したゲノム領域の検証および対象領域からの候補遺伝子の抽出には、特定のゲノム領域のみ別の近交系由来に置換したコンジェニック系統が必要である。そこで次に、任意の領域に対して約 1 年でコンジェニック系統を樹立する系の構築を行った。この系を試用し、先の解析で形質 L33 との関連が示唆された 6 番染色体全体が HNI 系統由来となっている Hd-rR 系統（コンソミック系統）を作成した。元系統である Hd-rR 系統と L33 の値を比較した結果、このコンソミック個体では有意に小さい値を示すことがわかった。これは QTL 解析結果と合致し、確かに 6 番染色体が L33 の多様性に関わっていることを示すものであった。

２．研究の目的

本研究では、上述の QTL 解析にて関連ゲノム領域が示された頭蓋顔面形質の多様性に関わる遺伝子を明らかにすることを目指した。ターゲットの形質は、上述の L33 に加え、D29 と V13 である。それぞれの形質に対し、以下の染色体が関連ゲノム領域として示唆されていた。

（１）L33：6 番染色体
（２）D29：15 番染色体
（３）D29：22 番染色体
（４）V13：5 番染色体

これら形質・領域の関連を検証および形質関連遺伝子の探索を進めた。

３．研究の方法

QTL 解析にて見出した形質ゲノム関連領域より遺伝子を同定するため、次の 3 ステップを実施する予定であった。ステップ 1：見出された関連ゲノム領域の検証、ステップ 2：領域内からの候補遺伝子の抽出、ステップ 3：候補遺伝子の検証、である。以下に各ステップの詳細を示す。

（１）ステップ 1：対象の染色体に対する HNI-Hd-rR 間のコンソミック系統を作成し、元系統との表現型比較解析を行った。

（２）ステップ 2：まずは形質関連ゲノム領域を十分に狭める必要がある。このため、対象ゲノム領域を部分的に置換したコンジェニック系統を複数作成し、元系統との表現型比較解析を行った。1Mbp 程度に狭めた後に、Hd-rR および HNI のゲノム情報を参照して候補遺伝子を抽出しようとしている。

（３）ステップ 3：該当遺伝子の発現解析に加え、トランスジェニックメダカや変異体などを利用し、該当遺伝子の発現が変化したときの表現型の変化を調べることにより、形質への影響を評価する予定であった。

尚、L33 と 6 番染色体との関連は既に確認できているため、この形質－染色体についてはステップ 2 から解析を進めた。

４．研究成果

以下に、形質－染色体毎に解析の結果を記す。

（１）L33－6 番染色体：形質関連ゲノム領域を狭めるため、最初に Hd-rR 系統を元系統とした二つのコンジェニック系統（LG6-A、LG6-B：図 1 参照）を作成した。これらの

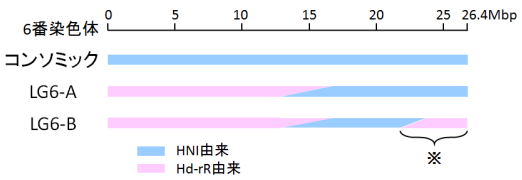

図1　6番染色体のコンソミック･コンジェニック系統

L33 における表現型を Hd-rR 系統と比較したところ、LG6-A 系統では有意な差が認められたが、LG6-B 系統では差が認められなかった（図 2）。従って、6 番染色体の端約 5 Mbp の領域（図 1：※の領域）に L33 に関わる遺

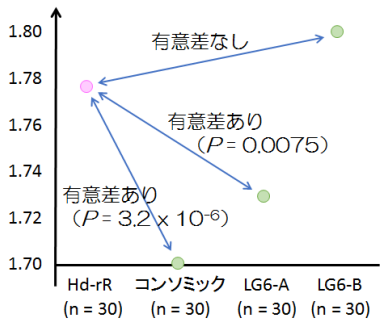

図2　コンジェニック系統を用いたL33に対する表現型解析結果

伝子のあることが示唆された。そこで、この 5 Mbp の形質への関与を検証するため、この領域を HNI 系統由来に置換したコンジェニック系統を作成した（図 3、LG6-C）。また解析のスピードを上げるため、LG6-C の系統作成と並行して対象の 5Mbp を更に細かく分断したコンジェニック系統も作成した。尚、このコンジェニック系統作成において、ゲノムが由来する系統を評価するため、5Mbp 領域内に新たな遺伝マーカーを 5 個設定した（図 3、下線で示された遺伝マーカー）。作成したコンジェニック系統は LG6-D～H の 5 系統である（図 3）。現在、LG6-C も含めた 6 系

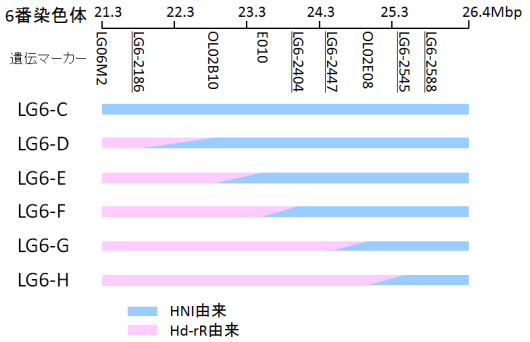

図3　L33関連ゲノム領域（5Mbp）内のコンジェニック系統

統の表現型解析を行うため、各系統の解析個体を準備している段階である。これらの系統は 0.5～1Mbp にてゲノム領域を刻んでおり、表現型解析の結果 0.5～1.5Mbp の形質関連ゲノム領域へと絞り込める見込みである。メダカにおいては、1Mbp に平均 29 遺伝子が含まれると見積もられている（引用文献②）ことから、6 系統のコンジェニック系統による解析が完了すれば、ゲノム情報を参照して候補の遺伝子をリスト化できると考えている。

（2）D29－15 番染色体：ステップ 1 として 15 番染色体に対するコンソミック系統の作成を手掛けたが、遺伝的にメスであるのに表現型がオスとなる現象が多発してしまった。この現象自体は性決定機構の視点からは非常に興味深いのだが、本研究の目的からは外れており解析不能の事態へ陥ってしまった。そこで、染色体全体を一度に置き換えることを断念し、半分ずつを置換したコンジェニック系統二系統を作成して QTL 解析の検証を行うこととした。図 4 に示した LG15-A、LG15-B のコンジェニック系統を樹立することができ、Hd-rR 系統との表現型比較解析を

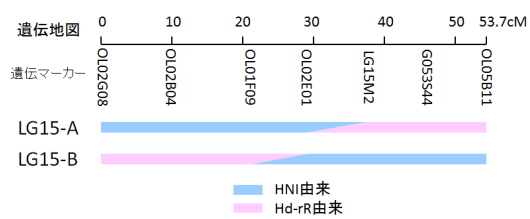

図4　15番染色体をカバーした二つのコンジェニック系統

行った。その結果、いずれの系統においても Hd-rR 系統との間に有意な差が認められなかった（図 5）。従って、QTL 解析結果の確認はできなかった。ただし LG15-A については、有意ではないものの QTL 解析による HNI アリルと同様の影響が比較的強く認められたことから、検出感度が低いため有意差が出なかった可能性も考えられた。

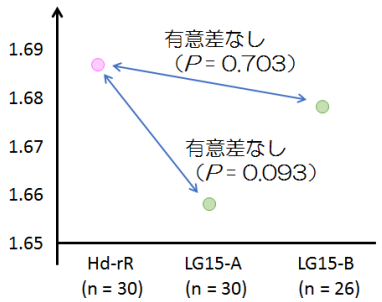

図5　15番染色体コンジェニック系統を用いた D29に対する表現型解析結果

（3）D29－22 番染色体：22 番染色体に対するコンソミック系統を作成し、Hd-rR 系統との表現型比較解析を行った。その結果、コンソミック系統は Hd-rR 系統の表現型とほぼ同じ値を示し、有意な差は見られなかった。従って、D29 に対する 22 番染色体の関与は否定され、QTL 解析結果は偽陽性であったことが示唆された。

（4）V13－5 番染色体：5 番染色体に対するコンソミック系統を作成したが、表現型解析を実施する前に他系統とのコンタミネーションを起こしてしまった。系統の作成をやり直すと時間がかかるため、既に樹立していた 5 番染色体のコンジェニック系統（LG5-A）を代わりに用いることとした。QTL 解析では 5 番染色体の一部のみが V13 に関わると示唆されており、LG5-A はその領域が HNI 系統由来に置換された系統であった（図 6）。

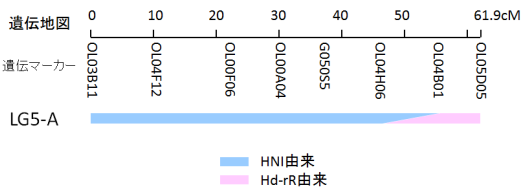

図6　5番染色体のコンジェニック系統

尚、コンタミネーションに気付くのが遅れたため、解析の大幅な遅れを導いてしまった。今後の対策として、コンタミネーションを起こさないよう細心の注意を払うことは勿論であるが、万が一起きてしまった場合に速やかに発見し対応できるよう、継代ペアの遺伝的モニタリングを毎世代必ず行うことにした。そのためのシステム構築も行った。

LG5-A 系統と Hd-rR 系統の表現型比較解析を行ったところ、この二系統間で有意な差が認められ、QTL 解析結果と合致することが

確かめられた（図 7）。ところが、今回新たに Hd-rR および HNI 系統の解析個体も準備して形質の定量を行ったところ、QTL 解析当時に観察された二系統の関係が逆転してしまうという結果が得られた。すなわち、QTL 解析時には Hd-rR 系統の方が小さい値を取っていたのに対し、今回計測し直した際には HNI 系統の方が小さい値を示したのである（図 7）。これは、V13 という形質が非常に不安定であり、環境の影響を受けやすい可能性を示唆している。従って、本解析により QTL 解析結果の検証に成功したものの、あまりにも不安定な形質であるため遺伝子同定までの解析を行うことは難しいと判断した。

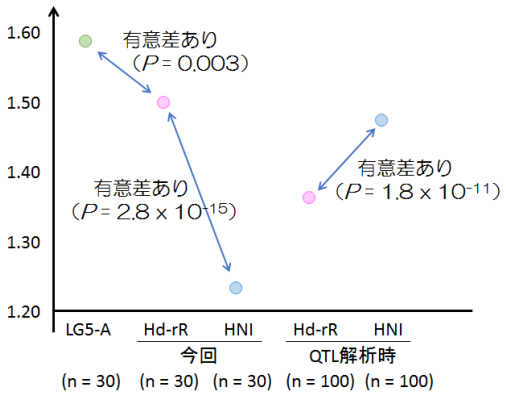

図7 コンジェニック系統を用いたV13に対する表現型解析結果

＜引用文献＞

① Tetsuaki Kimura, Atsuko Shimada, Noriyoshi Sakai, Hiroshi Mitani, Kiyoshi Naruse, Hiroyuki Takeda, Hidetoshi Inoko, Gen Tamiya, Minori Shinya. Genetic analysis of craniofacial traits in the medaka. Genetics 177:2379-88. 2007.

② Masahiro Kasahara, Kiyoshi Naruse, Shin Sasaki, Yoichiro Nakatani, Wei Qu, Budrul Ahsan, Tomoyuki Yamada, Yukinobu Nagayasu, Koichiro Doi, Yasuhiro Kasai, Tomoko Jindo, Daisuke Kobayashi, Atsuko Shimada, Atsushi Toyoda, Yoko Kuroki, Asao Fujiyama, Takashi Sasaki, Atsushi Shimizu, Shuichi Asakawa, Nobuyoshi Shimizu, Shin-ichi Hashimoto, Jun Yang, Yongjun Lee, Kouji Matsushima, Sumio Sugano, Mitsuru Sakaizumi, Takanori Narita, Kazuko Ohishi, Shinobu Haga, Fumiko Ohta, Hisayo Nomoto, Keiko Nogata, Tomomi Morishita, Tomoko Endo, Tadasu Shin-I, Hiroyuki Takeda, Shinichi Morishita, Yuji Kohara. The medaka draft genome and insights into vertebrate genome evolution. Nature 447:714-9. 2007.

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）

〔学会発表〕（計　3 件）

① Minori Shinya, Tetsuaki Kimura, Kiyoshi Naruse, Genetic analysis of quantitative traits: craniofacial morphology. Joint Meeting of the 22nd International Congress of Zoology & The 87th Meeting of the Zoological Society of Japan, 2016 年 11 月 14～19 日、沖縄コンベンションセンター（沖縄県・宜野湾市）.

②新屋みのり、木村哲晃、成瀬清、種内多様性を有する頭蓋顔面形態の遺伝学的解析、日本動物学会第 86 回大会、2015 年 9 月 17～19 日、新潟コンベンションセンター（新潟県・新潟市）.

③ Minori Shinya, Tetsuaki Kimura, Kiyoshi Naruse, Genetic analysis of quantitative traits: craniofacial morphology. 20th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting. 2014 年 9 月 20～21 日、慶應義塾大学芝共立キャンパス（東京都・港区）.

６．研究組織

(1)研究代表者

新屋　みのり（SHINYA, Minori）
慶應義塾大学・商学部・准教授
研究者番号：00372946

(2)連携研究者

成瀬　清（NARUSE, Kiyoshi）
基礎生物学研究所・バイオリソース研究室・特任教授
研究者番号：50208089