

論文の内容の要旨

論文題目

Identification of responsible genes for medaka *b*, *i-3*, and *ci* mutants by positional cloning.

(ポジショナルクローニング法によるメダカ *b*、*i-3*、及び *ci* 突然変異体原因遺伝子の同定)

氏名

深町 昌司

[序論]

動物の体色や模様は、皮膚組織に分布する「色素胞」と呼ばれる細胞集団によって形成され、自然界における種内・種間での視覚を介した情報伝達に重要な役割を持つ。色素胞は神経冠細胞に発生を由来し、その分化・移動・増殖のメカニズムはマウスの毛色突然変異体を使った研究で徐々に明らかにされつつある。しかし、ほ乳類は1種類の色素胞（メラノサイト）しか持っていないため、下等脊椎動物における複雑で色鮮やかな体色・模様形成のモデルになることは出来ない。また体色・模様の興味深い性質として、種固有の色・模様は厳密に固定されているにもかかわらず、明確な多様性がごく近縁な種間においても存在することが挙げられる。すなわち色素胞に関わる遺伝子群は、それぞれの種では厳密で固定的な発生調節を担うにもかかわらず、進化に伴う多様性の為の極端な遺伝的可塑性を併せ持っているということである。これらの一見矛盾する色素胞の性質は、遺伝子進化・ゲノム多様性をより一般的なレベルで考察するためにも最適な研究対象と言える。なぜなら、体色は最も明瞭、かつ最も多様性に富む動物の形質の一つであるからである。近年発生遺伝学のモデル生物としての有用性が確立されつつあるメダカには、体色異常の突然変異体が50系統以上も存在する。本研究ではうち3系統の体色形成異常突然変異体の原因遺伝子をポジショナルクローニング法により単離し、脊椎動物の色素胞発生に関わる新しい遺伝子を同定した。

1. *b* 遺伝子単離による、メラニン合成に関わる新規輸送タンパク質 AIM-1 (MATP)の同定

b 遺伝子座突然変異体は、少なくとも江戸時代中期には日本の庶民の間でヒメダカと呼ばれ飼育されていた系統である。*b* のオレンジ色の体色は、メダカに存在する黒・白・黄・虹の4種の色素胞のうち、黒色素胞内の色素（メラニン）を特異的に欠損することによる。私は **Amplified**

Fragment Length Polymorphism (AFLP)法により *b* 遺伝子座に連鎖する 18 個の DNA マーカーを検出し、うち 8 個を STS 化して高解像度

(545 減数分裂) の組み換え地図作製に用いた。*b* 遺伝子座と組み換えが 0 のマーカー (OPH3-1) を含むインサートサイズが約 200kb の BAC クローン(171M23)の両末端配列は、*b* 遺伝子座との間にそれぞれ組み換えが 4 と 5 検出された。更に、171M23 をコスミドにサブクローニングすることで *b* 変異候補領域を約 40kb に狭めた。このコスミド(C27)

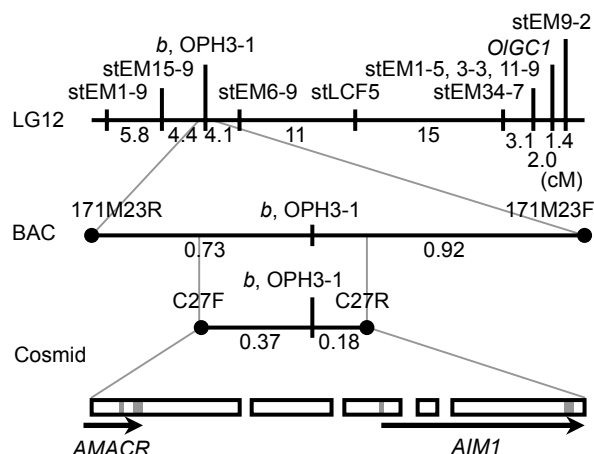


図 1. *b* 遺伝子座周辺の組み換え及び物理地図

のインサート配列から、*B* 候補遺伝子としてヒトメラノサイト特異的抗原をコードする *AIM1* を得た (図 1)。メダカ *AIM-1* は 576 アミノ酸からなり、12 の膜貫通領域を有する輸送タンパク質と予測された。*b* 遺伝子座自然/誘発突然変異体 8 系統のうち、7 系統から翻訳領域に変異を同定し、残る 1 系統は転写異常であることが示された。更に、全 *AIM1* を含むゲノム断片の *b* 変異体胚への導入により、メラニン合成能を回復できた。一方、マウスからも高い相同性を持つ *AIM1* 相同遺伝子を単離することができ、シンテニー解析から *underwhite* 変異体の原因遺伝子であることが推測された (後に別のグループにより証明された)。これらの結果から、1) メダカ *b* 遺伝子は *AIM-1* をコードすることが明らかになり、2) *AIM-1* は (脊椎動物で共通して) メラニン合成に関わることが示唆された。

2. *ci* 遺伝子単離による、魚類特異的ホルモン (ソマトラクチン) の機能同定

ci 遺伝子座突然変異体は、白色素胞と黄色素胞の増殖・形態形成に異常を示す。胚・幼魚期の表現型は顕著ではなく、成魚へ成長するにつれ白色素胞が著しく拡大・増殖し、逆に黄色素胞は減少する。*ci* の白色素胞は、神経伝達物質やホルモン等の外部刺激に対して細胞内部の色素顆粒を正常に拡散/凝集することが出来るが、背地の色に応じて細胞数・サイズを調節すること (形態的背地順応) ができない。さらに黒色素胞は背地に順応できることから、*ci* 遺伝子座は白/黄色素胞特異的に数・形態を調節するホルモン様因子をコードしていると考えられた。*ci* 遺伝子座周辺の高解像度組み換え地図の作成のため、443 匹の F2 を用いて 886 減数分裂を観察した。最も強く連鎖するマーカーから約 1.6cM 染色体を歩行し、*ci* 変異候補領域を含む BAC クローン (031N10) を単離した。ショットガン法により決定した 95%以上のインサート配列から、候補遺伝

子として機能未知の魚類特異的ホルモンであるソマトラクチン相同遺伝子を得た (図 2)。メダカソマトラクチンは 230 アミノ酸で構成され、その発現は脳 (脳下垂体) で最も強く検出された。また、転写量は白色背地 (白色素胞の拡大・増殖が起こる) で大きく抑制された。ci 変異体のソマトラクチン遺伝子は翻訳領域に 11 塩基の欠失を持ち、そのタンパク質はフレームシフトにより C 末端側を重度に (91 アミノ酸) 欠いている。加えて、脳での転写がほとんど検出されなかった。これらにより、1) ci はソマトラクチンをほぼ完全に欠損した変異体であり、2) ソマトラクチンは白色素胞の分化・増殖に対し抑制的 (黄色素胞に対しては促進的) に働き、3) その発現の抑制が白色背地における体色の明化を引き起こすことが示された。

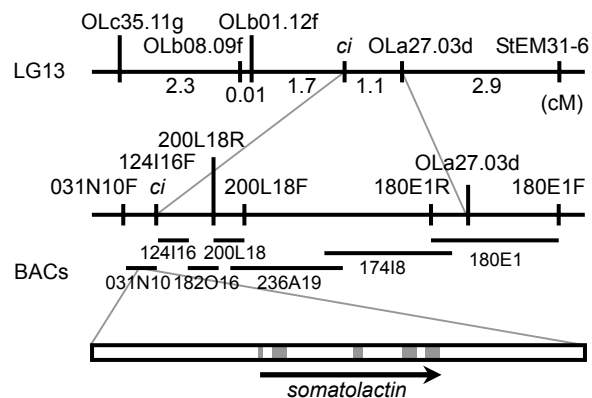


図 2. ci 遺伝子座周辺の組み換え及び物理地図

3. *i-3* 遺伝子座にコードされる P タンパク質は、脊椎動物に共通してメラニン合成に関わる

i-3 遺伝子座突然変異体は全身のメラニンを欠損し、ヒト・マウスの白子症 (oculocutaneous albinism; OCA) と類似する表現型を有する。シテニー解析から、メダカ *i-3* 遺伝子座周辺領域はヒト 19p13 に該当すると考えられたが、この領域にはヒト OCA1~4 型の原因遺伝子は存在せず、候補遺伝子を見出すことはできなかった。843 個体の F2 を用いて 1,686 減数分裂を観察し、高解像度の組み換え地図を作成した。最も近傍のマーカーから約 1.7cM 染色体を歩行し、*i-3* 変異候補領域をカバーする BAC クローン (129C11) を単離した (図 3)。そのインサート (約 220kb) には P (ヒト OCA2 型、及びマウス pink-eyed dilution 変異体の原因遺伝子) を含む 6 個の遺伝子が存在し、1 つを除き全てヒト 15q11 の遺伝子と相同であった。すなわち、ヒト・メダカ間のシテニー

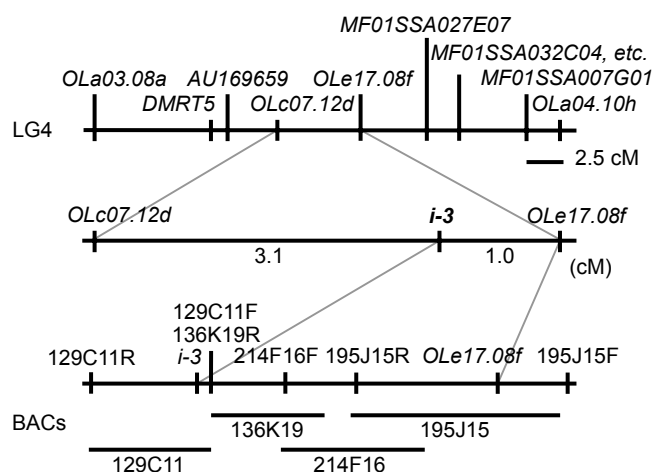


図 3. *i-3* 遺伝子座周辺の組み換え及び物理地図

解析は 200kb 程度であれば強く保存されているが、1cM ほど (約 1Mb) 歩行した先では必ずしも保存されていないことが示された。メダカ P は 842 アミノ酸からなる膜タンパクをコードする。ヒ

ト・マウスの P は 12 の膜貫通領域を有する機能未知の輸送タンパク質と考えられてきたが、私が行った解析ではヒト・マウス・メダカとも 11~14 と予測され、明らかな 2 次構造は決定できないように思われた。発現はメラニン産成細胞を含む眼球で強く見られたが、メラニンを産成しない卵巣及び受精卵では異なるスプライシングを受けた mRNA が発現していた。一方マウスの卵巣では、メダカのようなスプライシングバリエントは検出できなかった。i-3 変異体の P は翻訳領域における 4 塩基の欠失により重度 (393 アミノ酸) に C 末端側領域を欠いていた。以上の結果より、1) i-3 突然変異体の原因遺伝子は P であり、2) メダカはほ乳類には検出されない P のスプライシングバリエントを卵巣・受精直後の胚に持ち、3) P は脊椎動物で共通してメラニン合成に関わることが示された。

[結論]

本研究では、体色に関わる 3 つの遺伝子をポジショナルクローニングにより同定した。これらの研究成果は 2 つの重要な側面を持つ。一つは、メダカでも順遺伝学的研究が十分に機能することを示したことである。現在進行中の、ゲノムシーケンシングや大規模ミュタジェネシスの結果とあわせて、今後ますますこの様な方法での原因遺伝子同定が加速されていくと思われる。もう一つは、色素細胞の発生・調節に関する新たな知見を提供したことである。特に AIM-1 とソマトラクチンは、本研究により初めて機能が明らかになった遺伝子である。将来より多くのメダカ色素胞関連遺伝子を同定し、それらをマウス (黒色素胞しか持たない)・ゼブラフィッシュ (黒・黄・虹色素胞を持つが白色素胞を持たない) 等のモデル生物と比較することで、遺伝子進化と生物多様性とを関連づけたより一般的な考察が可能になるとと思われる。

[発表論文]

Naruse, K., Fukamachi, S., Mitani, H., Kondo, M., Matsuoka, T., Kondo, S., Hanamura, N., Morita, Y., Hasegawa, K., Nishigaki, R., Shimada, A., Wada, H., Kusakabe, T., Suzuki, N., Kinoshita, M., Kanamori, A., Terado, T., Kimura, H., Nonaka, M. and Shima, A. A detailed linkage map of medaka, *Oryzias latipes*: comparative genomics and genome evolution. *Genetics* **154**, 1773-84 (2000).

Fukamachi, S., Shimada, A. & Shima, A. Mutations in the gene encoding B, a novel transporter protein, reduce melanin content in medaka. *Nature Genetics* **28**, 381-385 (2001).

Nakayama, K., Fukamachi, S., Kimura, H., Koda, Y., Soemantri, A., & Ishida, T. Distinctive distribution of AIM1 polymorphism among major human populations with different skin color. *Journal of Human Genetics* **47**, 92-4 (2002).

Shimada, A., Fukamachi, S., Wakamatsu, Y., Ozato, K., & Shima, A. Induction and characterization of mutations at the b locus of the medaka, *Oryzias latipes*. *Zoological Science* **19**, 411-417 (2002).