

論文内容の要旨

論文題目

Establishing an Experimental System for the Functional Analysis of Human Genetic Polymorphisms Using Wild Medaka (*Oryzias latipes*) Populations

(ヒト遺伝的多型の機能解析を目的とした
メダカ集団を用いる実験系の構築)

氏 名 勝村 啓史

【序論】

ヒト (*Homo sapiens*) には多くの地域集団が存在し、集団間で様々な形質の違いが見られる。例えば、外観（皮膚色や毛髪、顔貌、さらには性的二型の程度など）が挙げられる。近年の大規模な集団サンプルを用いたゲノムワイド関連解析により、多くの形質関連遺伝子が報告されてきた。そして、遺伝子改変マウスを用いて、それらアレル間の機能上の違いを検出する表現型解析も行われている。しかし、そのようなアレルのほとんどは、それ単独では形質への寄与が非常に小さいことも明らかになってきた。そのため、従来の手法のように“遺伝的に均一”で“個”を用いる実験系では、効率よくアレル間の機能差を検出することは困難であり、アレルの違いと形質との因果関係は多くの場合、検証されないままとなっている。アレル間の微細な機能差を解析するためには、“地域集団間の遺伝的な違いが維持”されており、“個”では無く“集団”として比較し、アレル間の違いを頻度として定量できるモデル生物が有効と考えられる。そこで、私は地域集団が系統維持されて

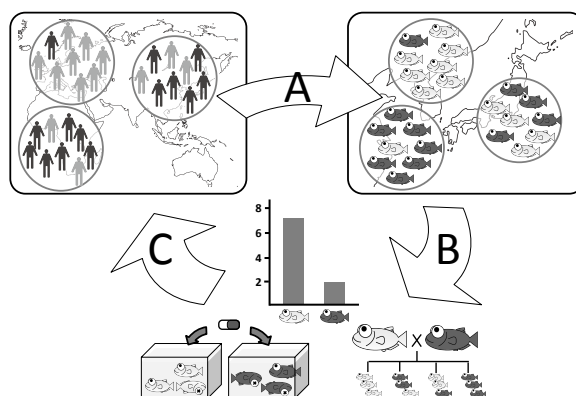


図1 本実験系概念図。ヒト集団と類似の遺伝的多型を相同遺伝子を持つメダカ集団をヒトのモデルとして解析する。まず、ヒト集団で見つかった多型がメダカ集団の相同遺伝子にも存在するかを調べる(矢印A)。そして、その多型の生体機能解析を行なうことにより、ヒトにおけるアレル間の機能差を推定する(矢印B)。これができればヒトの遺伝的多型の機能的理解につながる(矢印C)。

いるメダカ (*Oryzias latipes*) に着目し、図1に示す実験系を考えた。本研究では、ヒト集団間でアレル頻度が異なり、環境適応への関与も示唆されるシトクロム P450 (*CYP*) 遺伝子をテストケースとし、本実験系の可能性を検証した。

第1章 サンプリング方法の確立

まず、メダカ系統維持個体群で十分に集団間多様性が評価できるかを検討した。(I)東アジア 33 地域 35 個体の系統維持個体群 (grid-based samples) と (II) 関東地方 3 地域 373 個体の野生集団 (deme-based samples) を用いて、mtDNA D-loop の塩基配列から求めた集団遺伝学的統計値を比較した。その結果、gene diversity と nucleotide diversity は、(I)で得られたサンプル群で高く (表 1)、これは、地域集団の遺伝的分化を示し、grid-based sampling でも効率よく集団間多様性を評価できることを示す。

表1 集団遺伝学的統計値

Sampling methods	Groups	Populations	Number of individuals	Gene diversity	Nucleotide diversity ($\times 10^{-3}$)
grid-based sampling	北日本	13 地域集団	14	0.967	17.8
	南日本	16 地域集団	17	0.956	26.36
deme-based sampling		流山	124	0.805	13.11
	南日本	北浦	90	0.641	13.84
		小田原	154	0.225	6.7

第2章 メダカ集団内の遺伝的多様性の調査

野生メダカを用いてより厳密に自然選択の検証・議論をするには、より広くメダカの集団内多様性を明らかにし、集団構造と集団史を把握することが必要である。そこで南日本グループのメダカを中心に、佐賀、広島、岡山、沖縄で自ら野生メダカを採集し、さらに、北関東・東北のメダカ DNA サンプルを加え、計 13 地域 976 個体について mtDNA D-loop の塩基配列を決定した。遺伝子系統樹解析から、北部九州集団が系統樹のルートに位置し、もう一つの北部九州集団が本州メダカ集団とクラスターするパターンを示した (図 2)。これは、現在の南日本グループのメダカの遺伝的多様性が、北部九州を起源とすることを示唆する。

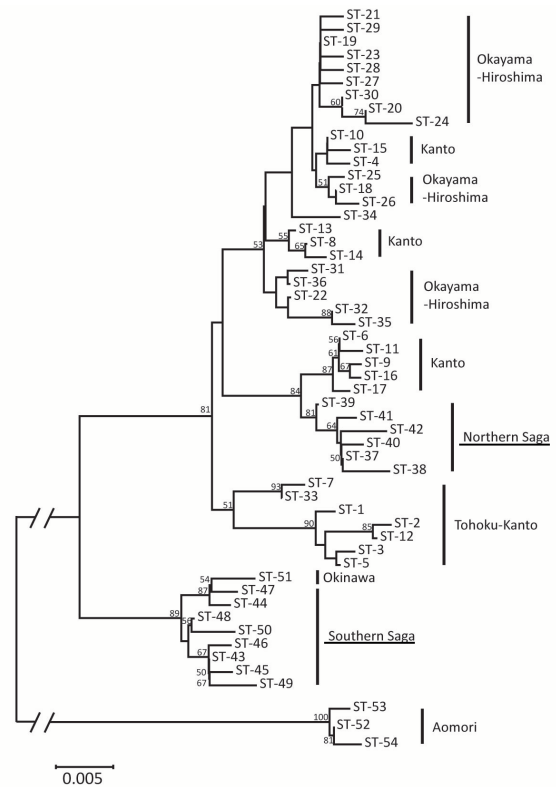


図2 mtDNA・D-loop配列タイプに基づく南日本グループメダカの遺伝子系統樹。下線は、北部九州集団を示す。Aomoriは外群として加えた北日本グループ。

第3章 メダカ集団における多型の探索及び機能解析

メダカ *CYP* とヒト *CYP* について、20 個のオルソログ (種分化由来の相同) 遺伝子ペアを同定した。そのうち、メダカの *CYP1A*、*CYP1B1*、*CYP5A1*、*CYP20A1* について、ヒトで SNP が存在する領域と相同であるメダカのゲノム領域を対象に、27 地域のメダカ集団の塩基配列を取得した。その結果、メダカ *CYP* においてもアミノ酸レベルで多様なバリエーションが存在することが示された。

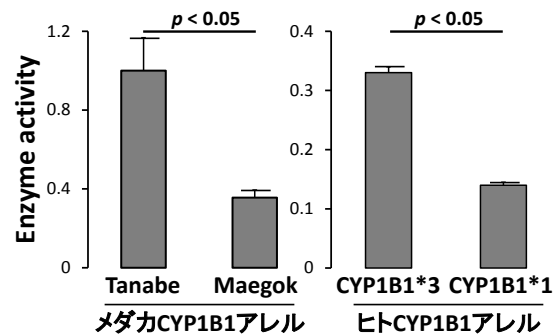


図3 メダカとヒトCYP1B1の酵素活性比較。ヒトCYPの結果は、Chavarría-Soley *et al.* (2008) から引用、改変。

次に、メダカ集団間で見つかった *CYP* アレル間の機能比較を行った。その結果、地域集団 Tanabe と Maegok の *CYP1B1* アレル間に酵素活性の有意な差が見られた ($p < 0.05$) (図 3 左)。測定に用いた基質は、ヒト *CYP1B1* のアレル間でも有意な活性差を示す (図 3 右)。以上から、メダカ集団には機能的にヒトと同様なアレルバリエーションが存在することを示した。

第 4 章 *CYP1B1* 共通多型の機能解析

CYP は、ステロイドホルモン合成・代謝に関わる。*CYP1B1* は、エストロゲンの代謝に関与する。メダカでは、エストロゲン濃度と二次性徴形質である尻ビレ長が相関するとの報告がある。以上から、*CYP1B1* 活性の違いがメダカの性的二型の程度に関連する可能性を考え、高活性型 *CYP1B1* アレルを持つ Tanabe と低活性型 *CYP1B1* アレルを持つ Maegok を用いて、遺伝子型間で尻ビレ形態に違いが見られるかを検討した。

まず、メダカの全長画像を取得し、体長と雌雄差が見られる尻ビレ第 4 条鰭長 (尻ビレ長 (前)) と尻ビレ後方 2 番目条鰭長 (尻ビレ長 (後)) を測定した (図 4)。その結果、Tanabe の雌雄間で、尻ビレの形 (尻ビレ長比) に有意な違いが観察された (図 5)。

次に、*CYP1B1* の遺伝子型の尻ビレ形態への関与をさらに検証するために、Tanabe と Maegok を交雑させ、F2 を作成した。それら F2 を同様に計測し、高活性 *CYP1B1* (Tanabe 型) と低活性 *CYP1B1* (Maegok 型) のどちらのアレルを持つかをタイピングした。その結果、尻ビレ長比において Tanabe 型のホモ個体 (TT) とヘテロ個体 (TM) の雌雄間にそれぞれ有意な違いが示された (図 6)。さらに、計測デー

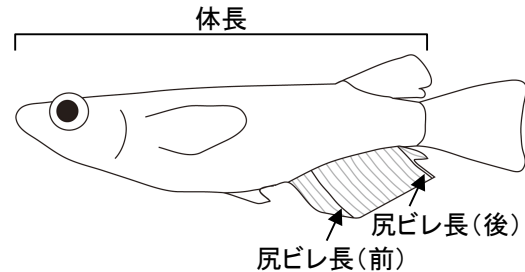


図4 メダカの形態計測項目(オス)。メスでは、特に尻ビレ長(後)が短い。

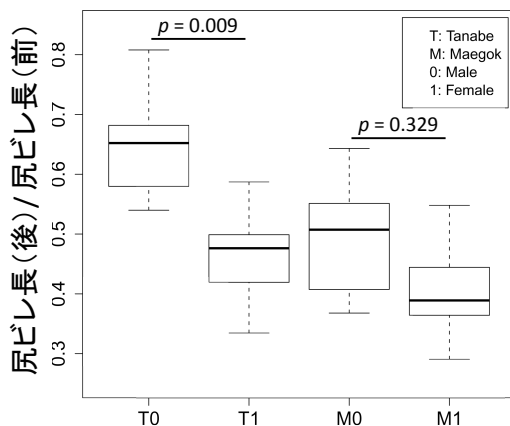


図5 地域集団TanabeとMaegokの雌雄間比較。

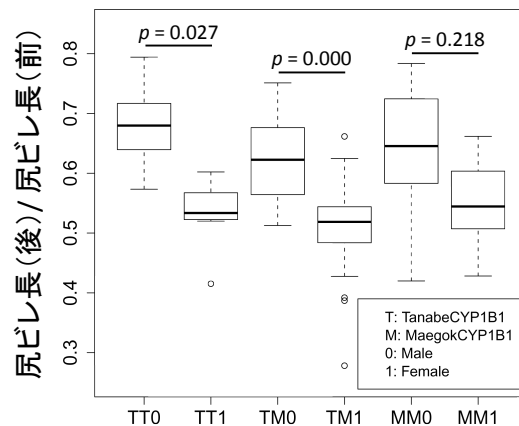


図6 F2個体の*CYP1B1*遺伝子型・雌雄間比較。

タから大きさ成分を除いた C-SCORE からマハラノビスの一般化距離 (D^2) を求めた。その結果、Tanabe 型のホモ個体群 (TT) における雌雄間の距離は、Maegok 型のホモ個体群 (MM) に比べ、大きい値を示した (図 7)。以上の結果は、*CYP1B1* の遺伝子型がメダカ雌雄間の尻ビレの形の違いに関与することを示唆する。

ヒト *CYP1B1* において、アレル間で酵素活性が異なる (図 3 右)。そこで、それらアレルの *CYP1B1* ハプロタイプ頻度を調べた。その結果、高活性型 *CYP1B1**3 ハプロタイプ頻度は、アフリカ人で高く、次にヨーロッパ人となり、アジア人では、12%以下であった (図 8)。性的二型を示す歯冠データを用いた形態人類学の結果から、アフリカ人やヨーロッパ人では、アジア人と比較して性的二型が顕著で

あることが示されている。ヒトにおいても CYP1B1 酵素活性と性的二型の程度の違いのパターンが一致する。以上のヒトでの結果と今回のメダカの結果から、CYP1B1 は地域集団間の性的二型の程度に関与する多数の遺伝子の中の一つであることを示唆する。

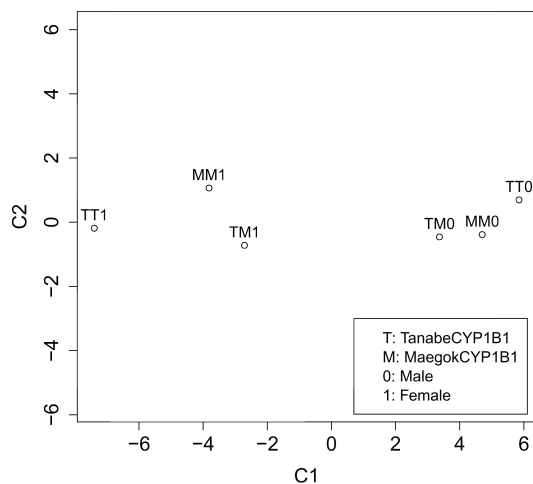


図7 C-SCOREから求めた遺伝子型・雌雄間のマハラノビスの一般化距離(D^2)。古典的多次元尺度構成法により、2次元化した。

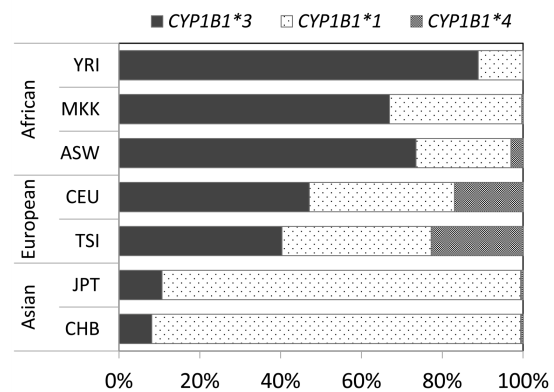


図8 ヒトCYP1B1ハプロタイプ頻度グラフ。
YRI: ヨルバ人、MKK: マサイ人、ASW: アフリカ系アメリカ人、CEU: ヨーロッパ系アメリカ人、TSI: イタリア人、JPT: 日本人、CHB: 中国人

【結論】

本研究結果は、メダカ集団からヒト集団と同様の多型を見つけ、メダカの表現型解析からヒトでの機能推定が可能であることを示す。これにより、豊富な多様性を持つメダカ地域集団を用いることで、ヒトで地域集団間の形質の違いをもたらす遺伝子多型を分析し、そのメカニズムを解明できることを示唆する。また、機能遺伝子において系統的に離れた生物種間において共通する多型が見出され酵素活性に違いが見られたことは、ヒトとメダカの分子レベルでの収斂進化を想像させる。これが中立進化の結果なのか自然選択の結果なのかは、現時点では判断できないが、サンプリングを続けている野生メダカ DNA サンプルを用いることで、集団遺伝学的に検証することは十分可能である。以上のことから、野生集団、地域集団（系統維持個体群）、近交系が揃っているメダカは、多型と形質との関係をより深く理解するための有効なツールといえるだろう。

【発表論文】

Katsumura, T., Oda, S., Tsukamoto, K. *et al.* (2012). A population genetic study on the relationship between medaka fish and the spread of wet-rice cultivation across the Japanese archipelago. *Anthropol. Sci.*, in press.

Hiwatashi, T., Mikami, A., **Katsumura, T.** *et al.* (2011). Gene conversion and purifying selection shape nucleotide variation in gibbon L/M opsin genes. *BMC Evol. Biol.*, 11: 312

Katsumura, T., Oda, S., Mano, S. *et al.* (2009). Genetic differentiation among local populations of medaka fish (*Oryzias latipes*) evaluated through grid- and deme-based sampling. *Gene*, 443: 170-177.

Ishii S., **Katsumura T.**, Shiozuka C. *et al.* (2008) Anti-inflammatory effect of buckwheat sprouts in lipopolysaccharide-activated human colon cancer cells and mice. *Biosci Biotechnol Biochem.*, 72: 3148-57