

**(独) 科学技術振興機構
創造科学技術推進事業
追跡評価用資料**

**近藤誘導分化プロジェクト
(1998-2003)**

2009. 10. 3

目次

目次.....	1
概要.....	エラー! ブックマークが定義されていません。
第1章 プロジェクトの概要.....	5
1.1 プロジェクト発足時における科学技術や社会の背景	5
1.2 プロジェクトの狙いと目的.....	6
1.3 プロジェクトの独創性.....	7
1.4 プロジェクト終了時点における主な研究成果とその意義	8
1.4.1 「分化シグナルグループ」の主な研究成果	8
1.4.2 「分化変異グループ」の主な研究成果	9
1.4.3 「分化遷移グループ」の主な研究成果	12
第2章 プロジェクト終了から現在に至る状況	13
2.1 各研究テーマの現在の状況.....	13
2.1.1 「分化シグナルグループ」の研究テーマのプロジェクト終了後の状況	13
2.1.2 「分化変異グループ」の研究テーマのプロジェクト終了後の状況	18
2.1.3 「分化遷移グループ」の研究テーマのプロジェクト終了後の状況	25
2.1.4 発表論文と被引用件数	25
2.2 プロジェクトメンバーの活動状況.....	30
第3章 プロジェクト成果の波及と展望.....	32
3.1 科学技術への波及.....	32
3.2 社会経済への波及.....	36

概要

「近藤誘導分化プロジェクト」は、分化調節遺伝子に及ぼす誘導効果の面から、細胞分化の多様性を生み出す細胞間相互作用の普遍的なメカニズムを分子レベルで解明することを目的として、1998年10月から2003年9月まで3グループで実施された。

第1のグループは、誘導・分化に重要な役割を果たしているシグナル伝達分子に焦点を当てた研究を行った。その結果、活性をもつ可溶性 Wnt3a タンパク質の調製法を独自に開発し、また、脊椎動物の体節形成に関わるゼブラフィッシュの突然変異体を作製し解析した。

第2のグループは、本プロジェクトの主力テーマとして、世界ではじめて大規模なメダカの突然変異体のゲノムワイド・スクリーニングを実施し、メダカの飼育管理システムを完成させるとともに、これまでゼブラフィッシュでは得られていなかった脳神経関係および生殖関連等の突然変異体を多数取得しその遺伝子解析を行った。それらをもとにメダカの生物学的データベースを作成した。

第3のグループは、両生類の水晶体再生をモデルにして、発生過程と再生過程における制御機構の異同を解析した。また、外来遺伝子をイモリに導入する技術を開発しトランスジェニックイモリの作製に成功した。

ERATO 終了後、第1グループのテーマは岡崎統合バイオサイエンスセンターおよび基礎生物学研究所に引き継がれ、脊椎動物の体節形成メカニズムに関する新しい発見と、その制御に関わる新しい分子の発見に発展した。また、Wnt タンパク質が細胞外に分泌されるために必須の不飽和脂肪酸側鎖を発見し、これまで不明な点の多かった Wnt タンパク質の分泌メカニズムの理解を助け、発生、再生、がん化など幅広い生命現象の分子メカニズムの解明につながるとして注目された。

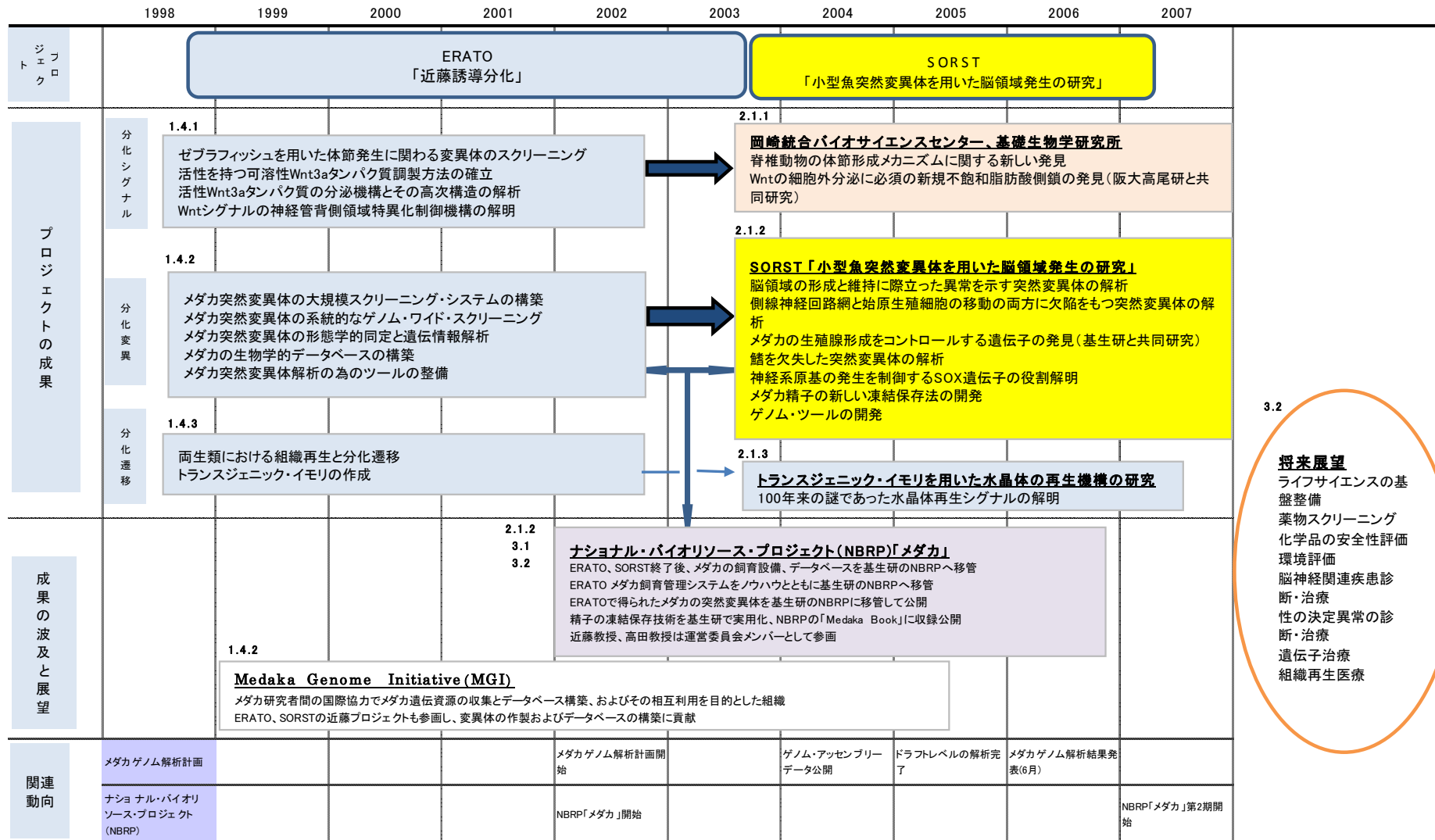
第2グループの研究は、発展研究(SORST)として、主として ERATO で得られた脳領域に関する変異体に焦点を当てた研究が3年間継続実施された。脳神経系に異常を示す突然変異体の詳細な解析を行うとともに、基礎生物学研究所と協力して、新しくメダカの生殖腺形成をコントロールする遺伝子を発見し、動物の性分化のメカニズムの解明につながる成果として注目された。また、メダカ精子の効率的な凍結保存法、メダカの飼育管理ノウハウ、ゲノムツールなどをデータベース化して、メダカの特徴を生かした発生遺伝学的研究の基盤構築に貢献した。

第3グループの研究は大阪大学の近藤研究室の研究テーマの一つとして継続されているが、ERATO で作製したトランスジェニックイモリを用いた研究成果は、イモリの目の再生研究に新しい潮流をもたらし、また、イモリを現代的な研究に活用したことによって若い研究者層を刺激し、イモリ研究者集団を構成する気運のひとつを作った。

近藤プロジェクトの成果はその後の発展研究と合わせて論文や学術講演として発表され、学術面で発生生物学の発展に貢献するとともに、日本独自のバイオリソースとしてメダカの地位を世界にアピールする役割を果たした。とくに第2グループの研究は、我が国で同時期に計画されていたメダカゲノムの全塩基配列決定を考慮して実施されたもので、メダカゲノム研究の価値を著しく高めた。

科学技術や社会への貢献としては、メダカやゼブラフィッシュを研究用に飼育し継代するシステムを完成させ、精子の凍結保存技術を含め詳細な飼育管理ノウハウをマニュアル化し、ナショナル・バイオリソース・プロジェクト（NBRP）「メダカ」のデータベースとして一般に公開したこと、および、メダカの突然変異体を網羅的にスクリーニングし、その特性を解析して変異体のデータベースを充実させたことである。

これらの成果はNBRP「メダカ」のバイオリソースとして世界の研究者の利用に供され、ゼブラフィッシュとともに脊椎動物のモデル動物として、小型で取扱いが経済的な特性を生かして、今後、医薬・医療・環境評価等の分野で広く利用され、科学の進歩と国民生活に貢献すると考えられる。



(図) 近藤誘導分化プロジェクトの展開状況

注) 枠の左肩の数字は、記載のある項目番号

第1章 プロジェクトの概要

1.1 プロジェクト発足時における科学技術や社会の背景

近藤誘導分化プロジェクトは1998年10月に開始され、2003年9月に終了した。

ここ20–30年間における分子生物学の飛躍的な発展により、これまで形態学的な観察手段に頼っていた発生生物学の領域でも、発生・誘導・分化のメカニズムを分子レベルで追跡できるようになった。しかし、その研究はまだ始まったばかりで、これから解明されるべき多くの課題が残されていた。

1992年から1996年にかけてドイツのマックスプランク研究所のNusslein-Volhardと米国マサチューセッツ総合病院のDrieverらは、脊椎動物ではじめてゼブラフィッシュを用いた変異体の体系的なスクリーニングを行った¹。

1995年には我が国の「ヒトゲノムプロジェクト」がスタートし、日米英の国際共同研究が始まり、2001年に国際ヒトゲノム解析コンソーシアムとセレーラ・ジェノミックス社によって同時にヒトゲノムのドラフトシーケンスが発表された²。それと前後して、多数の生物種のゲノムが解読されつつあった。

一方、我が国の第1期科学技術基本計画(1996年～2000年)において、知的基盤の整備の方針が打ち出され、その中で、標準、試験評価方法、生物遺伝資源、遺伝子資源、材料等を整備、収集、保存、蓄積することが重要であるとされた³。

これを受けて、文部科学省は2002年度からナショナル・バイオリソース・プロジェクト(NBRP)を発足させ、ライフサイエンスの総合的な推進を図るために、実験動植物やES細胞など幹細胞、各種生物の遺伝子材料等の生物資源のうち、国が戦略的に整備することが重要なものについて体系的な収集・保存・提供等を行うための体制を整備することになった⁴。

¹ Haffter P, et al, Development 123, 1-36, 1996、および、Driever W, et al, Development 123, 37-46, 1996

² Nature 409, 860-921, 2001、および、Science 291, 1304-1351, 2001

³ 科学技術基本計画 http://www.mext.go.jp/b_menu/shingi/kagaku/kihonkei/honbun.htm

⁴ ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)情報公開サイト <http://www.nbrp.jp/>

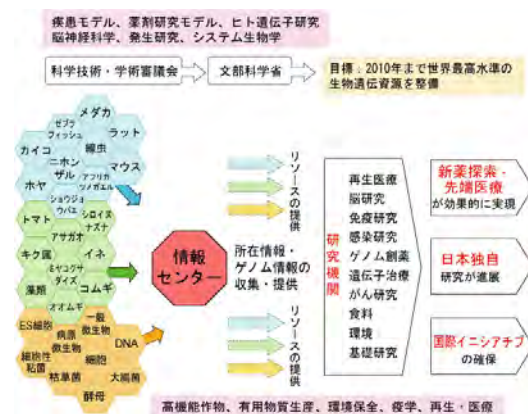


図 1 NBRP の実施体制 (NBRP 情報公開サイトより転載) 4

日本固有の生物資源であるメダカについても、2002 年度から 2006 年度まで 5 年間名古屋大学を中核機関としてナショナル・バイオリソース・プロジェクト(NBRP)「メダカ」が実施された⁵。このプロジェクトは、その後 2007 年度からは基礎生物学研究所を中核機関としてさらに 5 年間継続されている⁶。

同時に、メダカのゲノム解析が 2002 年から文部科学省の特定領域研究の一環として国立遺伝学研究所と東京大学の共同で実施された。その結果は 2007 年 6 月 7 日の Nature に発表された⁷。

1.2 プロジェクトの狙いと目的

このような時代背景のもと、近藤誘導分化プロジェクトは、一見無関係にも見える多様な細胞の分化の間にみられる共通性を明らかにし、細胞分化の多様性を生み出す源である細胞間相互作用の普遍的なメカニズムの解明を目的として計画された。

脊椎動物の発生において、高度な組織形成を支える細胞分化の基盤となる新しい原理を抽出することに主眼を置き、新たな実験系を開発し課題の展開を目指した本プロジェクトは、将来性と新規性に富む萌芽的アイディアを緊急かつ集中的に実現するという ERATO プロジェクトの趣旨に沿ったものであった。

本プロジェクトは次の 3 研究グループの協力体制によって行われた。

(1) 「分化シグナルグループ」は、誘導・分化に細胞外シグナルに依存した転写制御が重要な役割を果たしており、その為のシグナル伝達分子分野の補強が必要との構想から、

⁵ 若松佑子 東海畜産学会報 16, 10-12, 2005

⁶ 成瀬清 BioResource now ! No.3, August 2007

⁷ Kasahara, M. et al, Nature 447, 714-9. (2007).および、国立遺伝学研究所プレスリリース (2007/06/04)

その方面の専門家である京都大学助教授の高田慎治をスカウトしグループリーダーとして設定された。近藤寿人は有能な人材である高田が、将来キーマンとしてこの分野を発展させてくれることを期待した。(以下特に必要の場合を除き、名、役職、敬称、省略)

このグループでは細胞分化における組織間相互作用を担うシグナル伝達因子の重要なメンバーのひとつである Wnt タンパク質(以下 Wnt と略称)に注目し、独自の研究を遂行すると共に、「分化変異グループ」のシグナル分子システムの研究をサポートした。

(2) 「分化変異グループ」は、古谷一清木誠(以下旧性の「古谷」を省略)をグループリーダーとして、主としてメダカをモデル動物として用い、大規模な飼育管理システムを構築し、細胞分化機構の調節に関わる遺伝子の突然変異体を系統的に分離し、その原因遺伝子を突き止めることを目指した。

これまでにゼブラフィッシュでの網羅的変異体のスクリーニングが行われ、古谷も以前はそれに参加していたが、発生学的実験から予想された変異体は十分得られていなかった。また、パイロットスクリーニングでメダカの変異体の表現系がゼブラフィッシュと異なることから、メダカとゼブラフィッシュでは遺伝子機能の重複の仕方が異なることと予想された。

メダカは本邦でこれまで基盤整備が進められてきた小型淡水魚類であり、脊椎動物で本格的な Forward Genetics による分化機構解明ができる有力な系とされている。その為に、メダカの飼育管理システムとノウハウを日本に定着させ、作製した突然変異体を日本独自のバイオリソースとして世界に発信し、科学技術の基盤整備に貢献することを目的とした。

(3) 「分化遷移グループ」は、近藤自らがリーダーを兼務し、研究者 1 名、技術者 1 名、近藤研のポスドク 1 名で大阪大学の研究施設を使って研究を行った。

イモリの組織再生は現象的には古くから知られており、日本でもよく研究されていたが、これまでの研究方法は古典的な印象が強かった。これまで、一旦特定の組織に分化した細胞は元に戻らないといわれてきたことが、イモリなどの両生類ではそうでないことが分かってきたことから、その現象を発生・分化機構の研究を通じて理論的に解明することを試み、再生医療のための基礎固めに貢献することを目指した。

1.3 プロジェクトの独創性

突然変異体を用いて脊椎動物の細胞分化、胚の発生メカニズムを新しい切り口で追跡するために、大学の研究とは切り離して、世界ではじめてメダカ突然変異体の大規模スクリーニングシステムを確立したことは、本プロジェクトの大きな特色となっている。

6000 個の飼育装置で 10 万匹のメダカを飼育するという試みは、これまで世界にも例

がなく、ERATO でなければできないスケールの大きい仕事であった。

ゲノムプロジェクトは変異体がなければその価値は減少し、変異体の研究はゲノムが解明されることで促進されるという相互補完関係にある。

近藤はメダカのゲノムが日本で近く解読されるというタイミングを見越して、メダカの変異体を網羅的に作製し、その機能を解析することがその後の発生生物学の発展に重要な役割を果たすという認識から、それを中心課題に据え約 2/3 の戦力をこれに当てている。

2002 年公開の中間評価報告書⁸では、「本研究プロジェクトで用いられているアプローチはいずれも非常に斬新で、『細胞分化の基本的原理の探求』という発生生物学における未踏の課題に果敢に挑むものである。特に、メダカとゼブラフィッシュに人工的に突然変異を起こさせ、それら変異体を系統的にスクリーニングし、それらの原因遺伝子を突き止めるという試みは、個体レベルから遺伝子レベルまでの全過程を把握することにより細胞分化の基本的原理を探求する上での強力な方法論を提供する。」と評価されている。

1.4 プロジェクト終了時点における主な研究成果とその意義

1.4.1 「分化シグナルグループ」の主な研究成果

(1) ゼブラフィッシュを用いた体節発生に関わる変異体のスクリーニング

脊椎動物の胴体の基本的なパターンがどのようにして決まるのかを解明するために、体節形成に関わる突然変異体に特化したゼブラフィッシュ変異体のスクリーニングを行い、約 60 系統の新しい突然変異体を単離した。得られた変異体を解析することにより、初期卵割の調節や体節形成について新しい情報を得た。

(2) 活性を持つ可溶性 Wnt3a タンパク質調製方法の確立

Wnt が細胞外に分泌されやすいマウスの L 細胞を用いて、これまで得られていなかった純度の高い可溶性活性 Wnt3a タンパク質（以下 Wnt3a と略称）の調製方法を独自に開発した。

Wnt シグナルによって引き起こされる発生現象がどのような分子機構によって制御されているかについては不明な点が多かった。その理由の一つは活性を有する可溶性の Wnt の調製が困難なことであり、世界中の研究室で Wnt 調製の試みが多くなされたが成

⁸ 近藤誘導分化プロジェクト中間評価報告書

<http://www.jst.go.jp/erato/evaluation/20020930-1/02-prj4.html>

功していなかった。

高田らはタグ付き Wnt3a を発現する L 細胞株を樹立し、その細胞培養上清から Wnt3a を精製する方法を確立し、可溶性の活性 Wnt3a を高純度で得ることに成功した。

(3) Wnt の分泌機構とその高次構造の解析

新しく調製された活性のある可溶性 Wnt3a を用いて、Wnt の分泌、伝播、シグナル伝達に関わる化学的性質を解析し、分泌における脂質修飾の重要性、Wnt と受容体 Fizzled との作用特異性の関係を解明した。

(4) Wnt シグナルの神経管背側領域特異化制御機構の解明

Wnt1、Wnt3a シグナルに着目し脊髄神経管の領域特異性の確立における役割をノックアウトマウスなどを用いて解析し、Wnt シグナルが脊髄神経管の背側領域における特異化を実際に制御していることを解明した。これまで、神経系の増殖因子であるとみなされてきた Wnt が、前脳の神経幹細胞に対してはニューロン分化促進因子として作用し、感覚系では分化ニューロンのタイプを直接抑制するなど通説を覆す発見をした。

この成果は神経発生における Wnt 分子群の新規な機能を示すものとして 2004 年公開の事後評価報告書⁹でも高く評価されている。

抗 Wnt3a モノクロナル抗体の製法特許が 1 件出願されているが、特許にはならなかった¹⁰。しかし、Wnt のよい抗体がまだないので Wnt の研究者にとっては十分有用性のある成果である。

1998 年～2003 年の本プロジェクト期間中に 13 報の論文が発表されている (2.1.4 参照)。

1.4.2 「分化変異グループ」の主な研究成果

(1) メダカ突然変異体の大規模スクリーニングシステムの構築

6000 個の飼育装置で 10 万匹規模のメダカを安全に飼育管理する大規模なシステムを世界ではじめて構築した。この為に約 1 年半の時間をかけた。

これを用いて、メダカ突然変異体の大規模なスクリーニングシステムを確立した。そこで確立されたメダカ飼育管理システムのノウハウは詳細なマニュアルとして整備さ

⁹ 近藤誘導分化プロジェクト事後評価報告書

<http://www.jst.go.jp/erato/evaluation/20040427/prj4.html>

¹⁰ 特開 2002-171970

れ、世界のメダカを用いる研究者に公開されている。

雄のファウンダー (founder) G0 を化学変異原エチルニトロソウレア (ENU) で処理して導入した点変異を、3 世代の交配によってホモにして劣勢変異を検出した (図 2)。

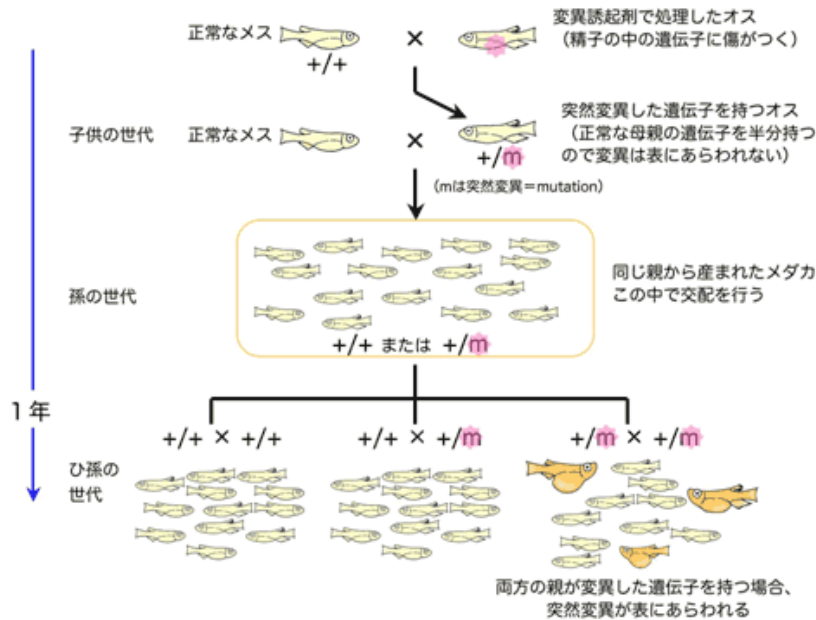


図 2 メダカの変異体の作製¹¹

(2) メダカ突然変異体の系統的なゲノムワイド・スクリーニング

メダカ突然変異体の大規模スクリーニングシステムと効率的な系統樹立システム、および、突然変異体の解析システムを活用して、約 25 万個の受精卵を検索し、メダカが受精後に発現・機能する遺伝子の約 70%、約 2,200 の胚性致死変異体を見出した。この中から、特異的な異常を示す 376 の突然変異体を得た。

(3) メダカ突然変異体の形態学的同定と遺伝情報解析

このスクリーニングによって得られた 376 の突然変異体の中に、これまでゼブラフィッシュでは見つからなかった脳機能領域の成立、特異化、機能発現に関する 53 の突然変異体を見出し、系統化することに成功した。

また、生殖腺に異常を示す突然変異体も *hotei* をはじめとして多数見つかった。このような生殖系列に関する突然変異体に関しては、ゼブラフィッシュではまったく解析が

¹¹ 近藤誘導分化プロジェクト研究成果集(図 1)
http://www.jst.go.jp/erato/project/kyb_P/kyb_P/01.html#zu01

進んでいないので、貴重な成果である。

その他にも興味深い変異体が多く見出されているが ERATO 終了時点では、基本的な、遺伝学的なデータ整備がなされた段階であり、変異体の原因遺伝子の解明と機能解析という本格的な研究は発展事業に委ねられた。

(4) メダカの生物学的データベースの構築

欧州分子生物学研究所 (EMBL) の Wittbrodt グループと共同で「メダカの遺伝子発現パターンデータベース」(Medaka Expression Pattern Database: MEPD) を作成した。さらに、「メダカ突然変異体の表現型データベース」(Medaka Mutant Phenotype Database: MMPD) を作成した。

また、メダカ研究者間の国際協力でメダカの遺伝子資源を効率的に収集し、相互活用しようという目的の、Medaka Genome Initiative (MGI) という機構があり¹²、本プロジェクトもそれに参画し、データベースの構築に貢献した。

(5) メダカの突然変異体解析のためのツールの整備

突然変異体原因遺伝子の解析のために、効率のよいメダカ/マウス雑種細胞株の Radiation Hybrid (RH) マップを構築し、元のデータからコンピュータの上で原因遺伝子を検索できるようにした。

また、メダカの発生、形態形成のマーカーとなりうる遺伝子群を選んで、その DNA を収集し、in situ hybridization probe の作成も行った。

1998 年～2003 年のプロジェクト期間中に発表された論文は 2 報(ゼブラフィッシュの変異体関連を除く)である。しかし、2004 年の Mechanism of Development 誌メダカ特集号に、13 報の ERATO 関連論文と 1 報の総説、1 報のテクニカルレポートが一举にまとめて掲載されている(2.1.4 参照)。

これにより発生生物学の生物モデルとしてメダカの地位を確立したのみならず、国内外におけるメダカを研究対象とした発生生物学の研究を活性化したことによる貢献は大きい。

2002 年度から文部科学省の「バイオリソースプロジェクト (NBRP) ・メダカ」が発足した。近藤もこのプロジェクトに参画しており、本研究で得られた貴重な突然変異体が効率よく維持、管理され、メダカ研究者のみならず広く国内外の発生生物学コミュニティに還元されるための基盤が整った。

¹² Medaka Genome Initiative (MGI) home page,
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/K-medaka/MGI2/MGI.html>

1.4.3 「分化遷移グループ」の主な研究成果

(1) 両生類における組織再生と分化遷移

イモリをはじめとする両生類で顕著な水晶体再生を例として、また新たに開発したトランスジェニック・アフリカツメガエル幼生を駆使して（図 3）、発生過程と再生過程における遺伝子作動機構を比較した。再生開始機構以外では、同一の制御機構が働いていることを明らかにした。また水晶体再生の開始に線維芽細胞増殖因子(FGF)ファミリー因子が関与することを示した。これに続くWnt因子の関与の発見と合わせて、100年来の水晶体再生シグナルに関する問題の多くの部分を解決した（2.1.3 参照）。

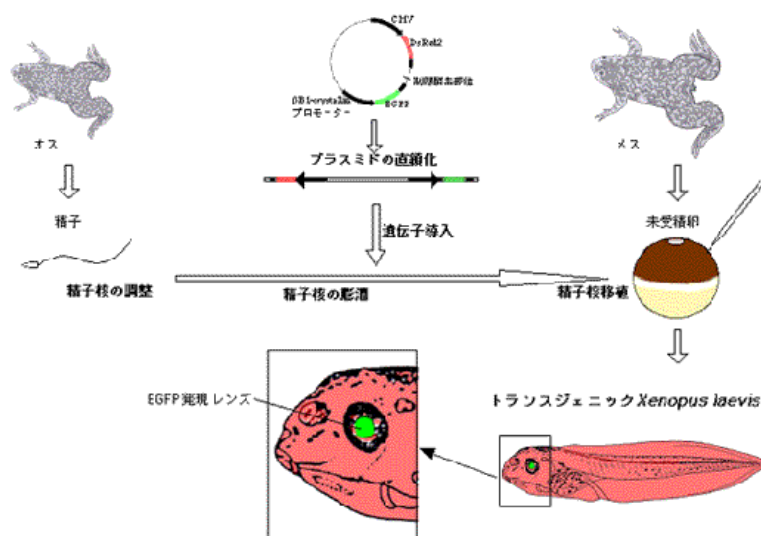


図 3 トランスジェニック *Xenopus* 幼生の再生研究への応用¹³

(2) トランスジェニックイモリの開発

外来遺伝子を個体レベルでイモリに導入する技術を新たに開発し、これを用いて、外来遺伝子の発現がモザイクになりにくいトランスジェニックイモリを効率的に作成することに成功した。これは再生機構の分子的解析に強力な技術的基盤を提供したものであるとして注目されている。

1998年～2003年のプロジェクト期間中に4報の論文が発表されている（2.1.4 参照）。トランスジェニックイモリの論文は2005年に発表されている¹⁴。

¹³ 近藤誘導分化プロジェクト研究成果集(図 6)

http://www.jst.go.jp/erato/project/kyb_P/kyb_P/06.html#zu06

¹⁴ Ueda Y, et al, Genesis 41, 87-98, 2005

第2章 プロジェクト終了から現在に至る状況

2.1 各研究テーマの現在の状況

2.1.1 「分化シグナルグループ」の研究テーマのプロジェクト終了後の状況

このグループの研究テーマはプロジェクト終了後、グループリーダーの高田が岡崎統合バイオサイエンスセンター分子発生学研究部門の教授として転出したためにそこに引き継がれた。研究員の高田律子も同時にその研究室に移籍し研究を継続している。

また、越田澄人も岡崎の基礎生物学研究所の助手として移籍し、高田と共にゼブラフィッシュに関する研究を発展させた。

ERATO 終了後の主な研究成果は下記のとおりである。

(1) 脊椎動物の体節形成メカニズムに関する新しい発見

ERATO で得られたゼブラフィッシュの突然変異体を用いて体節形成のメカニズムを解明する研究を行った。

遺伝学の研究方法としては、ランダムに遺伝子を破壊して作製した変異体の中から、表現型を指標にしてスクリーニングを行い原因遺伝子を突き止める古典的な順遺伝学(Forward Genetics)手法と、目的の遺伝子を選択的に破壊することで、その遺伝子の生体内における機能を解析する逆遺伝学(Reverse Genetics)手法がある。ゼブラフィッシュでもこれらの手法を用いた。

順遺伝学的手法で見つけた新しい発見は2つある。脊椎動物の骨、筋肉、神経系、などの細胞に分化していく体節という原始細胞群がある。脊椎動物の各体節は、発生の進行に従い頭部から尾部側に向けて順次作られるが、その際、体節は胚の後端に存在する未分節中胚葉 (PSM) から一定の時間間隔で順次くびれて切れることによって形成される。

越田らはこのような周期的な体節の構造がどのようにして形成されるかを研究し新しい成果に結びつけた。この分野の研究は世界的にあまり進んでいなくて、これに関与する分子はわずか数個しか分かっていなかったが、今回の研究で5個の新しい分子を同定した。

越田らはERATOで得られた体節形成に異常を呈する変異体を独自にスクリーニングした結果、前側の数体節において体節境界が形成されなくなる変異体を複数系統樹立し

た。ポジショナルクローニングによりその原因遺伝子をクローニングしたところ、3系統ではインテグリン $\alpha 5$ が、1系統ではそのリガンドであるフィブロネクチン(FN)が原因遺伝子であることを明らかにし、体節間にしっかりした境界が形成されるためには、フィブロネクチンとインテグリン $\alpha 5$ が必要なことを世界で初めて発見した。

まず、インテグリン $\alpha 5$ を足場にしてフィブロネクチンが集まってきてベースが形成されることにより細胞の極性(アピカル面とベーサル面)が決まり、その上にフィブロネクチンが集積されて細胞間に境界ができ、しっかりした体節が形成される。

すなわち、インテグリン $\alpha 5$ を足場にしてフィブロネクチンが集積することにより上皮細胞が極性を持ち、体節境界が維持されることを初めて示した。(図 4)

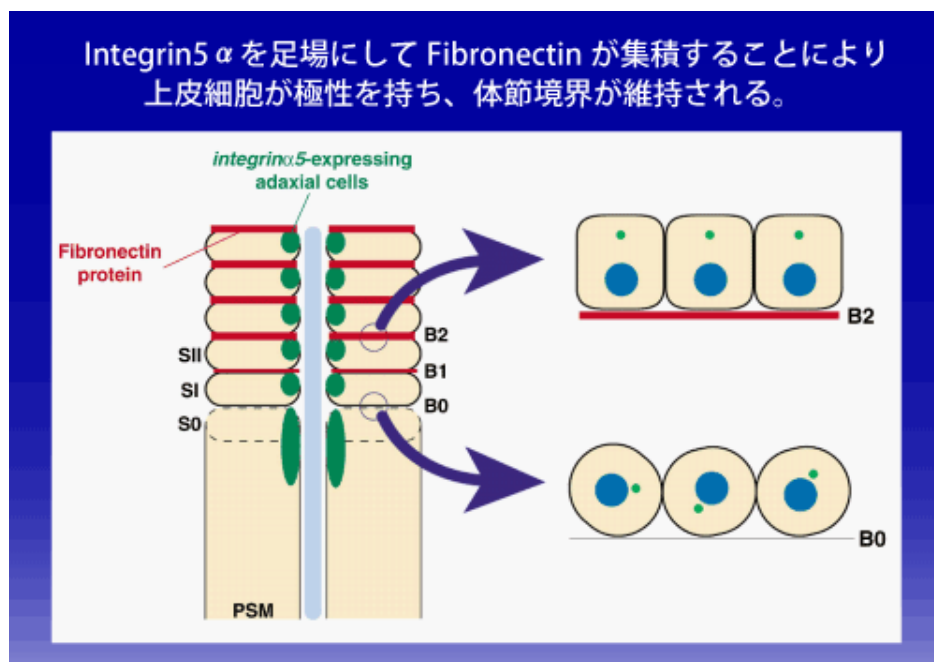


図 4 体節の形成機構 (高田研究室のホームページより転載) ¹⁵

この結果は 2005 年の Dev. Cell に論文発表された¹⁶。

体節の異常を示す変異体から見つかったもう一つの原因遺伝子は RTF1 因子である。これはノッチ(Notch)シグナル伝達系の異常にかかわり、転写の伸長反応のクロマチン蛋白に対する作用を示すことが分かっているが、なぜこの因子が変異すると体節形成異常が生じるかが、次の問題である。ノッチシグナル伝達と転写制御に対する新しい考え方を提供するものとして研究継続中である。

¹⁵ 高田研究室ホームページ http://www.nibb.ac.jp/~cib2/Publication/Pub_Koshida.html (論文の日本語解説)

¹⁶ Koshida S, et al, Dev Cell, 8, 587-598, 2005

逆遺伝学手法で見つけた新しい発見は2つある。

その一つが、*her13.2* という転写因子で、線維芽細胞増殖因子(FGF)濃度と分節形成を制御する時計を結び付けて制御する分子である。

川村らは、ゼブラフィッシュの PSM で発現する遺伝子を *in situ hybridization* でスクリーニングし、FGF シグナルと同様に PSM の後端から前方へと行くに従い発現が低下する遺伝子を発見した。この遺伝子は *Her1* や *Her7* と同じく転写抑制因子 *Hairy* (ヒトやマウスでは *Hes*) と類似の構造を持つ *Her13.2* をコードしており、その発現は FGF シグナルにより誘導された。また、*her1* 遺伝子の発現振動にはそれ自身によるネガティブフィードバックが関わるものと考えられるが、*Her13.2* は *Her1* と直接結合し、*her13.2* 機能阻害胚では *her1* の発現レベルが上昇していた。

以上の結果から、*her13.2* は FGF シグナルと分節時計(Segmentation clock) と呼ばれる時計遺伝子を結びつける鍵となる因子であり、FGF シグナルはこの遺伝子の発現を PSM 後方で誘導することによって、*her1* のネガティブフィードバックが起こり、分節時計遺伝子の発現振動が維持されると考えられた。

これにより、PSM では *her13.2* の発現を介して FGF シグナルが時計(*her1*)を制御していることを初めて示した。(図 5)

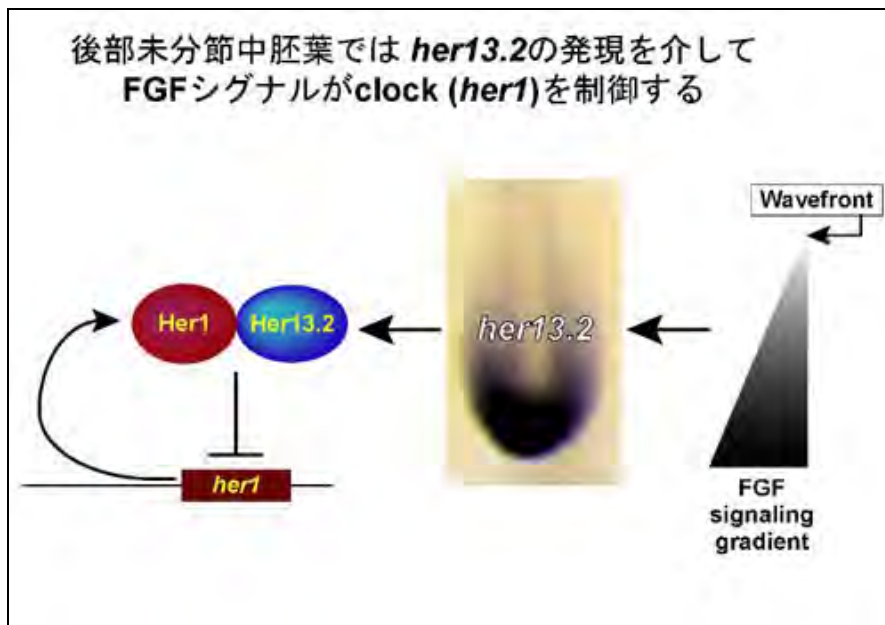


図 5 *her13.2* の働き (高田研究室のホームページより転載) ¹⁷

¹⁷ 高田研究室ホームページ http://www.nibb.ac.jp/~cib2/Publication/Pub_Kawamura2.html (論文の日本語解説)

分節時計の周期は FGF 濃度で決められ、FGF 濃度が高い間は時計が進んで分節形成が継続するが、FGF がある一定の閾値より低い濃度になると時計が止まって分節形成が完了する。しかし、なぜ FGF 濃度の変化が時計の動きを制御するか、そのメカニズムは不明であった。

her13.2は時計のタンパク質 her1(20 くらいの類似分子がファミリーを形成している)とヘテロ二量体を作って FGF 濃度と時計タンパク質(her1)を結び付け、遺伝子をより強力に抑制していることを突き止めた。これは、時計が正しいリズムを刻むのに重要で、FGF 濃度の変化で時計の動きが制御されるメカニズムを説明するものである¹⁸。

もう一つの成果は、PSM やそれを生じるもととなる尾芽と呼ばれる組織に特異的に発現する遺伝子を in situ hybridization 法を用いてスクリーニングしそれらを解析する過程で、PSM から体節にかけて“さざ波”のようなパターンで発現する Ripply 遺伝子を発見したことである¹⁹。

Ripply には 3 つのホモログがあり、WRPW(Trp,Arg,Pro,Trp)という特徴的なアミノ酸配列と、約 50 のアミノ酸からなる保存された領域を持つ。Ripply1 は WRPW の部分で転写共抑制因子 Groucho と結合して PSM における分節遺伝子の発現を終結させる働きをし、体節の前後極性の維持にも働くことがわかった。(図 6)

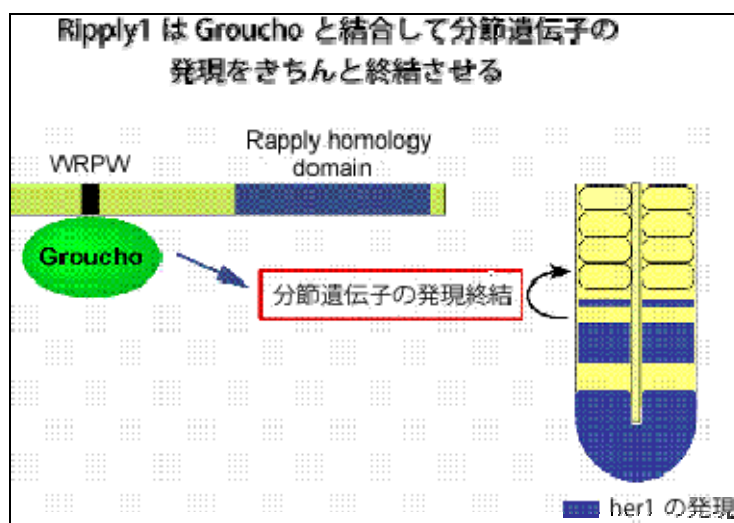


図 6 Ripply の働き(高田研究室のホームページより転載)²⁰

また、Ripply は発生等さまざまな生命現象を制御する転写制御因子である T-box と結合し、この因子を転写活性化因子から抑制因子へと変換していることを突き止めた。マウスの 3 つの Ripply 遺伝子のうち、Ripply1,2 が体節形成過程で発現するのに対し、

¹⁸ Kawamura A, et al, Gene Dev, 19, 1156-1161, 2005

¹⁹ Kawamura A, et al, Dev Cell, 9, 735-744, 2005

²⁰ 高田研究室ホームページ http://www.nibb.ac.jp/~cib2/Publication/Pub_Kawamura.html (論文の日本語解説)

Ripply3 は 鰓弓で発現することを見いだした。ERATO 発の一連の研究の発展により、高田は、体節形成の機構解明に大きく貢献した。

(2) Wnt の細胞外分泌に必須の新規不飽和脂肪酸側鎖の発見 (阪大高尾研と共同研究)

ERATO では Wnt3a の調製法を確立し、その化学的性質の解明に焦点を当てて研究を行った。この仕事は岡崎へ移ってから高田慎治、高田律子らによって継続されており、まだその研究成果の大半が論文化されていないが、その中で最も大きな成果は、パルミトレイン酸(図 7)というモノ不飽和脂肪酸が Wnt の 209 番目のセリン (Ser) についており、これがないと Wnt は細胞外へ分泌されないことを発見したことである。

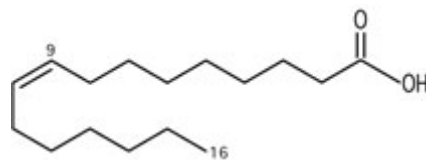


図 7 パルミトレイン酸の構造(基礎生物学研究所プレスリリースより転載)²¹

この分子の化学的構造解析には質量分析機器を用いた高度の分析技術が必要であり、大阪大学の高尾敏文教授の協力を得た。

これまで、Wnt の発見者である Nusse らが、2003 年に Wnt3a の 77 番目のシステイン (Cys) が飽和脂肪酸のパルミチン酸によって修飾されていることを報告していたが、不飽和脂肪酸がこのような形で蛋白質修飾に使われていることを見つけたのは世界で初めてである。現在までに、Wnt には 2 つの脂肪酸と 2 つの糖鎖が付加していることが知られている (図 8)。

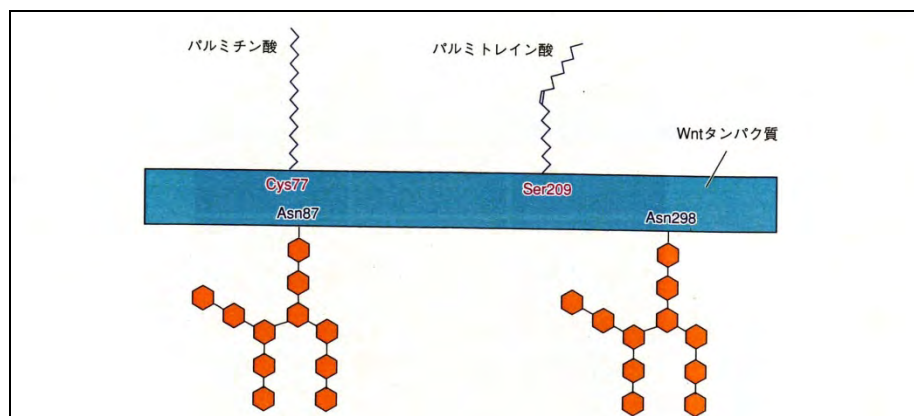


図 8 Wnt の翻訳後修飾(実験医学 26(3)362 図 1 を転載)²²

²¹ 基礎生物学研究所プレスリリース(2006.12. 04)(図 2)
<http://www.nibb.ac.jp/press/061203/061203.html>

このうち、Cys77 のパルミチン酸修飾は少なくとも分泌には関係しないこと、今回発見された Ser209 のパルミトリン酸修飾が Wnt の細胞外分泌に必須であることを初めて示した。この成果は 2006 年の Div. Cell に発表された²³。

この研究成果は、基礎生物学研究所プレスリリース (2006 年 12 月 4 日) で紹介され、日経産業新聞 (2006 年 12 月 6 日)、科学新聞 (2006 年 12 月 15 日) その他一般紙でも報道され²⁴、これまで不明な点が多かった Wnt の分泌メカニズムの理解を進め、発生、再生、がん化などの幅広い生命現象の根底をなす分子メカニズムの解明へと繋がるものとして注目された。また、Wnt の分泌量を適正にコントロールすることは、組織の再生や、がんの治療において重要となりうる問題であり、応用面への展開も期待されている。

今後この仕事をいろいろの方向に発展させたいと高田は述べている。たとえば、脂肪酸の種類が異なるとどのような作用が出てくるか、なぜ脂肪酸が付くのか、脂肪酸がつかないとなぜ細胞外へ分泌されないのか、など興味深いテーマである。

2.1.2 「分化変異グループ」の研究テーマのプロジェクト終了後の状況

このグループの研究テーマは発展研究 (SORST) として 2003 年 10 月から 2007 年 3 月まで「小型魚突然変異体群を用いた脳領域発生の研究」(研究代表者 近藤寿人) という課題のもとに継続実施された。最初の 6 か月は ERATO の整理と結果のまとめに当てられたので、SORST の実質研究期間は 3 年間であった。

SORST の主な目的は、ERATO の研究で作製したこれらのメダカ胚発生に関わる突然変異体を活用し、小型魚の実験動物としての特性を生かして脊椎動物の脳の各々の領域の発生機構を解明することであった。

SORST では ERATO で得られたメダカ突然変異体のうち、25 種類の突然変異体についてその変異が位置する染色体 (Linkage Group) を確定した。そのうち、8 種類の突然変異体については、その原因遺伝子を確定し、突然変異体の表現型を細胞レベルで詳細に解析することによって、発生過程を制御する機構を明らかにした。その成果は 2006 年公開の発展研究 (SORST) 研究終了報告書²⁵に記載されている。

2004 年には、Mechanism of Development 誌がメダカ特集号²⁶を発行し、37 報のメダカの研究論文が掲載されているが、そのうち 15 報(総説 1、テクニカルレポート 1 を

²² 高田慎治、高田律子 実験医学 26, 361-366, 2008

²³ Takada R, et al, Dev Cell, 11, 791-801, 2006

²⁴ 基礎生物学研究所プレスリリース (2006.12.4)、日経産業新聞 (2006.12.6)、科学新聞 (2006.12.15)

²⁵ 近藤寿人 戦略的創造研究推進事業 発展研究 (SORST) 研究終了報告書、
http://www.jst.go.jp/kisoken/sorst/hyouka/2006/pdf/h18_kondoh.pdf

²⁶ Special Issue: MEDAKA Mech Dev 121(7-8), 597-1007, 2004

含む)が ERATO 関係の論文である。ERATO、SORST の成果に関して発表された論文は上記の他に 16 報(総説 2 を含む)あり、計 31 報である(2.1.4 参照)。

また、2005 年に清木誠により、詳しい日本語の総説も書かれている²⁷。

SORST の研究終了報告書²⁵から、原因遺伝子を確定した 8 種類の突然変異体を(表 1)にまとめて示した。

表 1 SORST で原因遺伝子を確定した 8 種の突然変異体

No	変異体名称 (略号)	原因遺伝子(遺伝子座)	変異体の表現型
1	otafuku (ota)	Wnt8 をコードする遺伝子 (LG10)	正常では菱脳、脊髄になる運命の領域が、前部脳領域である間脳に変化する
2	hirame (hir)	細胞内タンパク質をコードする遺伝子(LG13)	神経胚後期から胚体全体が扁平になる
3	fukuwarai (fku)	上皮・細胞外マトリクス接着に関わるタンパク質の一つをコードする遺伝子 (LG21)	神経胚初期より主に神経上皮に強い変形が起こるため、各脳領域、眼球や嗅組織が頭部において秩序を失って配置される
4	kazura (kaz)	7 回膜貫通型ケモカイン受容体 CXCR4b をコードする遺伝子(LG21)	側線神経系の形成と、始原生殖細胞が生殖腺領域に向かって経路を変えながら移動する過程に同時に異常を示す
5	yanagi (yan)	7 回膜貫通型ケモカイン受容体 RDC1 をコードする遺伝子 (LG21)	側線神経系の形成と、始原生殖細胞が生殖腺領域に向かって経路を変えながら移動する過程に同時に異常を示す
6	hotei (hot)	AMH type II receptor (LG7)	①雌雄に関係なく起こる生殖細胞の著しい増殖 ②遺伝的には雄である XY 個体の半数における雌への性転換 ③精巣を持つ XY 個体に見られる早期の減数分裂の開始 ④卵巣を持つ個体における卵母細胞の成長の停止
7	zenzai (zen)	幕貫通型レセプターをコードする遺伝子(LG9)	生殖細胞が減少する
8	finless	death domain を持つタンパク質をコードし、ヒトの外胚葉形成異常症の原因遺伝子の一つに対応するメダカ遺伝子 (LG15)	ヒトの EDARADD (Ectodysplasin A receptor-associated adapter protein)のメダカ・ホモログである可能性がある。 EDARADD はヒトの外胚葉形成異常症の原因の一つである。

(1) 脳の領域の形成と維持に際だった異常を示す突然変異体の解析

ERATO の研究では 25 万個のメダカ受精卵を検索して、1,600 種の致死突然変異体を同定し、その中から 376 種の胚発生に関わる突然変異体を研究の対象にしている。このうち、52 種が脳の形成に関わるものであり、ゼブラフィッシュでは見られなかった新しい表現系をもつものも多く得られていた。

²⁷ 古谷一清木誠 感染・炎症・免疫 35-4, 305-312, 2005

遺伝子座 LG10 にマップされた *otafuku* 変異体の原因遺伝子に関し、バクテリア人工染色体(BAC)を用いた染色体歩行、候補遺伝子の塩基配列変異の同定を行うことによって、*otafuku* 遺伝子が分泌性の Wnt8 をコードすることを明らかにした。

細胞運命解析により、正常では菱脳、脊髄になる運命の領域が、前部脳領域である間脳に変化していることが判明した。

このことから、後部脳領域は最初から特異化が起こらなかったと考えられた。これは「前部神経板と後部神経板は独立した機構で生じ、後部神経板の成立に Wnt8 が重要な役割を果たしている」ことを示した最近のニワトリ胚を用いた研究結果を支持するもので、神経板の領域ごとの形成機構の解明に貢献した²⁵。

hirame と *fukuwarai* の 2 つの突然変異体はマクロの形態形成過程において極めてユニークな表現型を示し、ゼブラフィッシュでは類似した表現型を示す変異体は得られていない。

hirame では神経胚後期から胚体全体が扁平になる。*fukuwarai* では、神経胚初期より主に神経上皮に強い変形が起こるため、各脳領域、眼球や嗅組織が頭部において秩序を失って配置される。

前方神経系(終脳、間脳、中脳)に異常のある変異体の要約を清木誠の総説²⁷の(図 5)を転載して(図 9)に示した。

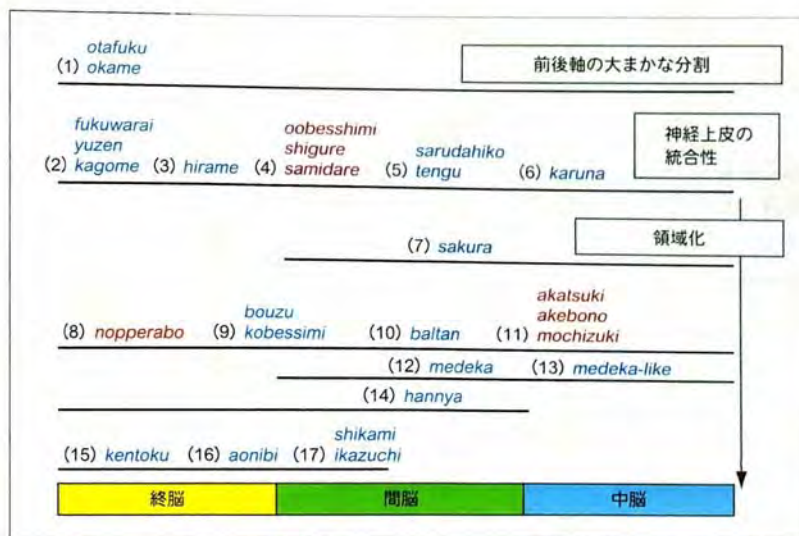


図 9 前方神経系(終脳、間脳、中脳)に異常のある変異体の要約²⁷

(注)脊椎動物の前方神経系は、前から後ろに向かって、終脳、間脳、中脳が形成される。

²⁷の変異体は、表現系から 17 群の変異体群に分類され、同じ群では似た表現型を示す。遺伝子座と線は、どの領域に異常を示すかを示す。青字で示した遺伝子座は、変異体の表現系がメダカで初めて見出されたもの、赤字は、ゼブラフィッシュの変異体と類似した表現型を示したもの。²⁷の変異体により、前後軸の大まかな分割、神経上皮の統合性、領域化を制御する遺伝子群が必要であることが判明した。

(2) 側線神経回路網と始原生殖細胞の移動に同時に欠陥を持つ突然変異体の解析

kazura、yanagi の 2 つの突然変異体は、側線神経系の形成と、始原生殖細胞が生殖腺領域に向かって経路を変えながら移動する過程の両方に異常を示した。このことから、細胞群の移動や伸張を伴う過程に広く関わるシグナル受容体系に異常を持つことが予想された。

kazura と yanagi は、遺伝子座 LG21 の異なった座位にマップされ、ポジショナルクローニングの結果、それぞれ 7 回膜貫通型ケモカイン受容体である CXCR4b、RDC1 (CXCR7) をコードすることが明らかになった²⁸。

CXCR4b が始原生殖細胞の移動の制御に関わることは、ゼブラフィッシュの突然変異体を用いた研究で示されていたが、RDC1 の関与は新しい知見である²⁵。

(3) メダカの生殖腺形成をコントロールする遺伝子の発見(基生研と共同研究)

突然変異体 hotei の表現型は以下の通りである。

- ・雌雄に関係なく起こる生殖細胞の著しい増殖
- ・遺伝的には雄である XY 個体の半数における雌への性転換
- ・精巣を持つ XY 個体に見られる早期の減数分裂の開始
- ・卵巣を持つ個体における卵母細胞の成長の停止



図 10 メダカ突然変異体 hotei (上) と通常のメダカ (下) の外観の違い

(基礎生物学研究所プレスリリースより転載)²⁹

メダカ変異体 hotei は、生殖細胞が異常増殖し、生殖腺(卵巣・精巣)が肥大化し、外

²⁸ Sasado T, et al, Dev Biol 320, 328-339, 2008

²⁹ 基礎生物学研究所プレスリリース(2007.05.29) <http://www.nibb.ac.jp/press/index.html#070529>

見上大きく膨らんだおなかを持つことが特徴である。

ERATO 及び SORST の研究に研究推進委員としても参画した基礎生物学研究所の田中実准教授は、森永千佳子研究員と共同でこのメダカ変異体 *hotei* を使って、性決定システムの解明を行い、性決定における生殖細胞の役割を初めて明らかにした³⁰。

性転換は動物によってはしばしば認められる現象であるが、そのメカニズムは解明されていない。また、将来の卵や精子となる細胞（生殖細胞）の数がどのように制御されているかも、明らかにされていなかった。

メダカは本来 Y 染色体をもつ個体が雄となり、その性は終生変わることはない。しかし、この突然変異体メダカは遺伝的に雄となる Y 染色体を持っているにもかかわらず、その約半数が雌へと性転換する。また、性転換が生じる、生じないに関係なく、雌雄ともに将来の卵や精子となる生殖細胞が異常増殖し、生殖腺は大きな卵巣または精巣（あるいはその中間型）へと発達することを世界で初めて発見した。

この変異体 *hotei* の原因遺伝子が抗ミュラー管ホルモン受容体タイプ II (anti-Muellerian hormone type II receptor : *amhr II*) であることが同定された。これまで抗ミュラー管ホルモン (AMH) シグナル系に関しては、哺乳類等で雌の生殖器の原基であるミュラー管を退化させる活性が強調されていたが、本研究で魚類を用いて明らかにした AMH シグナルによる生殖細胞の増殖と性決定の制御は、AMH シグナルが関わる原始的な制御過程を明らかにするもので、この研究成果の意義は大きい。

本研究チームはまた、哺乳類において既に知られている生殖腺付属器官(卵管・子宮、輸精管など)が雄雌それぞれの付属器官に発達するために必須のメダカ遺伝子ホモログが、メダカで生殖細胞の発達と性分化に関与することを発見した。これにより、同定された遺伝子が哺乳類特有の機能だけでなく、魚類からヒトに至るまで動物の間で広く共通の生殖腺形成と性分化の機能をもつ重要な遺伝子であることが予想され、これまで明らかにされていなかった動物の性分化のメカニズム解明に、今後重要な進展をもたらすものとして注目された³¹。

田中実はコールド・スプリングハーバーの「性決定の国際シンポジウム」で "Modes, location and function of germ cells in the ovary of teleost fish, medaka" という演題で招待講演を行い、*hotei*、だけでなく *zenzai* など含む複数の変異体を駆使した研究成果を報告している³²。

(4) 鰭を欠失したメダカ突然変異体の解析

成魚において全ての鰭を欠く突然変異体 *finless* の変異は遺伝子座 LG15 にマップさ

³⁰ Morinaga C, et al Proc Natl Acad Sci USA 104, 9691-9696, 2007

³¹ 基礎生物学研究所プレスリリース (2007.05.29) 及び JST、NIBB 共同発表資料 (2007.05.29)

³² Tanaka M, Cold Spring Harbor Laboratory Meeting "Germ Cells" (Oct. 1-5, 2008)

れた。同定された原因遺伝子は、**death domain** を持つタンパク質をコードしており、ヒトの外胚葉形成異常症の原因遺伝子の一つに対応するメダカ遺伝子の可能性がある²⁵。

(5) ゼブラフィッシュの神経系原基の発生を制御する **sox** 遺伝子群の役割解明

神経系で発現する **sox** 遺伝子群の中でも、特に **group B1** に属する遺伝子は、神経系の初期発生に重要な役割を果たしている。ゼブラフィッシュには、**sox1a/b, sox2, sox3, sox19a/b** の 6 個の遺伝子が存在することを明らかにした。哺乳類、鳥類では **sox2** の発現が中枢神経系原基全体を覆うのに対して、魚類ではその役割を **sox19a/b** が担うことが明らかになった²⁵。

(6) メダカ精子の凍結保存法の開発

多数のメダカ突然変異体を安定に保存するためには、簡便で信頼性の高い精子凍結技術が不可欠である。既存のプラスチックバイアルを使用する凍結法をガラス毛细管を用いた方法で改善し、凍結手順を簡略化すると共に再現性を向上させた。

この方法は **SORST** 終了後、笹戸隆雄が基礎生物学研究所に移籍し、保存した精子を解凍時に高い確率で元に戻せることを確認した。したがって、現在では全てこの方法で変異体が保存されている³³。

また、この方法はマニュアル化されて、その英語版が **NBRP 「Medaka Book」**³⁴ に収録されて世界の研究者に公開されている。

(7) ゲノムツールの開発

マウス-メダカ雑種細胞を用いたメダカ染色体の **RH** パネルを作成し、突然変異体遺伝子のマッピングと遺伝子クローニングの補助とした。遺伝子座 **LG12, 17, 22** に関しては、枠組みマーカーが染色体全体に分布したデータを得た³⁵。また、精子凍結保存技術の確立と、メダカの突然変異体作製に関する経験を生かして、京都大学(藤堂・武田グループ)と共同研究でメダカ突然変異体の **Targeting Induced Local Lesions In Genomes (TILLING)** ライブラリーを作成した²⁵。

以上のように、網羅的に単離、収集したメダカの突然変異体の中から、発生過程における脳領域の形成機構の解明に役立つ変異体や、生殖細胞の増殖と性分化に関する変異

³³ 基礎生物学研究所 成瀬清准教授談

³⁴ NBRP “Medaka Book”, <http://www.shigen.nig.ac.jp/medaka/medakabook/>

³⁵ Su F, et al, Dna Res, 14, 135-140, 2007

体に注目し新しい発見に結びつけたことがこの発展研究(SORST)の特色である。その他にも遺伝子を確定したものも多くある。

そこから得られた結果をまとめてデータベースを作成し、メダカの特徴を生かした発生遺伝学的研究の基盤を構築し、今後この分野の研究に貢献出来る礎を築いた意義は大きく、特筆すべき成果と言える。

国内外の学会での講演等も多数あり、特に研究代表者近藤寿人が 2004 年に Cold Spring Harbor Laboratory 2004 Meeting で行った招待講演 ”Medaka fish and their mutants”³⁶ の内容は、Science 誌にこの国際会議における注目講演として取り上げられ紹介されている³⁷。これによってメダカ変異体の学術的価値が世界の研究者に広く認識されるようになった。

ERATO、SORST で使用したメダカの飼育設備は、プロジェクト終了後その約半分が基礎生物学研究所に移設され成瀬清准教授のもとで活用されている。残りは、その他の大学・研究機関に移管されて有効活用されている。

ERATO で得られた突然変異体は、飼育ノウハウ及びデータベースと共に、基礎生物学研究所に移管され、成瀬のもとで管理され、NBRP「メダカ」のバイオリソースとして、世界の研究者に公開されている。

NBRP「メダカ」の情報公開サイト³⁸には、2008年12月現在で557種の突然変異体が登録されている。このうち、347種がERATOで得られた突然変異体であり、その特徴と内訳は次のとおりである。

表 2 近藤プロジェクト胚発生の誘起突然変異体の特徴とその数

No.	変異体の特徴	変異体の数
1	前脳形態発生の異常	28
2	生殖細胞発生の異常	16
3	胸腺発生の欠陥	15
4	肝臓発生の異常	11
5	網膜発生の異常	10
6	体節発生の異常	9
7	始原生殖細胞(PGC)分布と数の異常	8
8	網膜天蓋軸索経路の異常	8
9	肝臓発生と始原生殖細胞 (PGC)分布の異常	2
10	前脳形態発生、始原生殖細胞 (PGC)分布、と、肝臓発生の異常	2
11	前脳と体節形態発生の異常	2
12	前脳形態発生と肝臓発生の異常	2
13	外側線と始原生殖細胞 (PGC)分布の異常	1

³⁶ Kondoh H, Cold Spring Harbor Lab. 2004 Meeting on "Evolution of developmental diversity" New York, USA

³⁷ Science 304(5669), 383-384, 2004

³⁸ "NBRP MEDAKA" <http://www.shigen.nig.ac.jp/medaka/>

14	小眼	1
15	前脳形態発生と始原生殖細胞 (PGC)の異常	1
16	前脳形態発生と始原生殖細胞 (PGC)分布の異常	1
17	放射感受性	1
	胚発生の突然変異体合計	118
	未分類の突然変異体	229
	突然変異体合計	347

2.1.3 「分化遷移グループ」の研究テーマのプロジェクト終了後の状況

(1) トランスジェニック・イモリを用いた水晶体再生機構の解明

このグループの研究テーマはERATO終了後大阪大学の近藤研究室のテーマの一つとして研究が継続された。

トランスジェニックイモリの論文は2005年のGenesisに発表され¹⁴、水晶体の光るトランスジェニックイモリの写真はGenesis誌掲載号の表紙を飾った。

また、イモリの水晶体再生過程の分子生物学的な研究を行い、FGFとWntが2段階に働いて水晶体が再生することがわかった³⁹。これは、イモリの水晶体の再生機構についてこれまで主流であった米国の研究者たちの説を覆すものであるとともに、イモリの眼の再生シグナルに関する100年の謎に決着をつけた⁴⁰。

組織再生関連では、8報の論文と1報の総説が発表されている(2.1.4参照)。

2.1.4 発表論文と被引用件数

近藤プロジェクト関連の論文(英文)は2009年1月現在で58報、総説等5報、計63報が発表されている。そのリストをテーマ分類別に被引用件数とともに(表3)~(表7)に示した。被引用件数はWeb of Scienceで検索した(検索日2009/02/03)

(1) Wnt関連の発表論文は16報ある、それらを(表3)に示した。

表3 Wnt関連の論文

No.	論文	被引用件数
W1	Yamaguchi TP, et al, Gene Dev, 13, 3185-3190, 1999	125
W2	Takeda K, et al, J Biol Chem, 275, 14013-14016, 2000	91
W3	Takeuchi S, et al, Genes Cells, 5, 71-78, 2000	63
W4	Hino S, et al, Mol Cell Biol, 21, 330-342, 2001	34

³⁹ Hayashi T, et al, Mech Dev 123, 793-800, 2006

⁴⁰ Hayashi T, et al, Develop Growth Differ, 50, 279-287, 2008 (Review)

W5	Ikeya M, et al, Mech Dev, 103, 27-33, 2001	55
W6	Kawamura Y, et al, Eur J Biochem, 268, 3036-3041, 2001	8
W7	Ueda Y, et al, Biochem Biophys Res Commun, 283, 327-333, 2001	13
W8	Yamanaka H, et al, EMBO Rep, 3, 69-75, 2002	166
W9	Muroyama Y, et al, Gene Dev, 16, 548-553, 2002	113
W10	Ueda Y, et al, Int J Cancer, 99, 681-688, 2002	21
W11	Momoi A, et al, Mech Dev, 120, 477-489, 2003	11
W12	Nakagawa S, et al, Dev Biol, 260, 414-425, 2003	33
W13	Oishi I, et al, Genes Cells, 8, 645-654, 2003	105
W14	Muroyama Y, et al, Biochem Biophys Res Commun, 313, 915-921, 2004	41
W15	Takada R, et al, Genes Cells, 10, 919-928, 2005	17
W16	Takada R, et al, Dev Cell, 11, 791-801, 2006	37

ERATO 期間中に被引用件数 100 以上の論文が 4 報発表されている。2004 年以降に 3 報の論文が発表されているが、W14 は Wnt と神経幹細胞の分化に関する論文、W15 は Win タンパク質と Fizzled に関する論文、W16 は Wnt の不飽和脂肪酸側鎖に関する新しい発見の主要論文である。

(2) ゼブラフィッシュ関連の論文は 7 報ある、それらを(表 4)に示した。

表 4 ゼブラフィッシュ関連の論文

No.	論文	被引用件数
Z1	Yoda H, et al, Differentiation, 71, 152-162, 2003	7
Z2	Kishimoto Y, et al, Mech Dev, 121, 79-89, 2004	13
Z3	Kawamura A, et al, Dev Cell, 9, 735-744, 2005	21
Z4	Kawamura A, et al, Gene Dev, 19, 1156-1161, 2005	31
Z5	Koshida S, et al, Dev Cell, 8, 587-598, 2005	36
Z6	Okuda Y, et al, Dev Dynam, 235, 811-825, 2006	17
Z7	Kawamura A, et al, Mol Cell Biol, 28, 3236-3244, 2008	4

Z1 は神経関連変異体スクリーニングの論文、Z2 は母性効果変異体に関する論文、Z3 と Z7 は Ripply に関する論文、Z4 は her13.2 に関する論文、Z5 と Z6 は体節形成機構に関する論文である。

(3) メダカ変異体関連の論文は 27 報ある、それらを(表 5)に示した。

表 5 メダカ変異体関連の論文

No.	論文	被引用件数
M1	Henrich T, et al, Nucl Acid Res, 31, 72-74, 2003	11
M2	Grabher C, et al, Gene, 322, 57-66, 2003	29
M3	Hirose Y, et al, Development, 131, 2553-2563, 2004	13
M4	Furutani-Seiki M, et al, Mech Dev, 121,647-658, 2004 (メダカ特集号)	49
M5	Elmasri H, et al, Mech Dev, 121, 659-671, 2004 (メダカ特集号)	9
M6	Kitagawa D, et al, Mech Dev, 121, 673-685, 2004 (メダカ特集号)	7
M7	Loosli F, et al, Mech Dev, 121, 703-714, 2004 (メダカ特集号)	6

M8	Yoda H, et al, Mech Dev, 121, 715-728, 2004 (メダカ特集号)	6
M9	Yasuoka A, et al, Mech Dev, 121, 729-738, 2004 (メダカ特集号)	12
M10	Iwanami N, et al, Mech Dev, 121, 779-789, 2004 (メダカ特集号)	10
M11	Watanabe T, et al, Mech Dev, 121, 791-802, 2004 (メダカ特集号)	12
M12	Sasado T, et al, Mech Dev, 121, 817-828, 2004 (メダカ特集号)	9
M13	Morinaga C, et al, Mech Dev, 121, 829-839, 2004 (メダカ特集号)	11
M14	Kelsh RN, et al, Mech Dev, 121, 841-859, 2004 (メダカ特集号)	14
M15	Aizawa K, et al, Mech Dev, 121, 895-902, 2004 (メダカ特集号)	5
M16	Khorasania MZ, et al, Mech Dev, 121, 903-913, 2004 (メダカ特集号)	12
M17	Henrich T, et al, Bioinformatics, 21, 3195-3197, 2005	8
M18	Deguchi T, et al, Zool Sci, 22, 321-332, 2005	2
M19	Taniguchi Y, et al, Genome Biol, 7, R116, 2006	7
M20	Sasaki T, et al, Genomics, 89, 124-133, 2007	4
M21	Morinaga C, et al, Proc Natl Acad Sci USA, 104, 9691-9696, 2007	9
M22	Su F, et al, Dna Res, 14, 135-140, 2007	1
M23	Saito D, et al, Dev Biol, 310, 280-290, 2007	5
M24	Iwanami N, et al, PloS Genet, 4, e1000171, 2008	0
M25	Sasado T, et al, Dev Biol, 320, 328-339, 2008	4
M26	Tanaka M, et al, Dev Growth Diff, 50, 273-278, 2008	0
M27	Miyamoto T, et al, Cell Tissue Res, 335, 465-71, 2009	0

2004年のMech Dev メダカ特集号に13報の論文が掲載されているが、M4はメダカ変異体のゲノムワイド・スクリーニングを総括した主要論文であり、被引用件数が最も多い。性決定機構に関する新しい発見の主要論文はM21 (hotei)とM23(zenzai)である。

M25は、始原生殖細胞、シグナル受容体の2分野で引用が大きく増えつつある。

(4) 組織再生関連の論文は8報ある、それらを(表6)に示した。

表6 組織再生関連の論文

No.	論文	被引用件数
L1	Mizuno N, et al, Differentiation, 65, 141-149, 1999	21
L2	Kondoh H, et al, Mech Dev, 96, 165-174, 2000	39
L3	Hayashi T, et al, Dev Growth Diff, 43, 361-370, 2001	7
L4	Mizuno N, et al, Dev Growth Differ, 44, 251-256, 2002	9
L5	Hayashi T, et al, Mech Dev, 121, 519-526, 2004	19
L6	Ueda Y, et al, Genesis, 41, 87-98, 2005	11
L7	Mizuno N, et al, Dev Growth Diff, 47, 131-140, 2005	2
L8	Hayashi T, et al, Mech Dev, 123, 793-800, 2006	7

L1とL7はアフリカツメガエル(Xenopus)、L2はゼブラフィッシュ、L3、L4、L5は両生類及びイモリのレンズ再生関連の論文、L6とL8はトランスジェニックイモリに関する論文である。

(5) その他に、総説4報、テクニカルレポート1報がある、それらを(表7)に示した。

表 7 総説及びテクニカルレポート

No.	総説・テクニカルレポート	被引用件数
S1	Shima A, et al, Embo Rep, 4, 121-125, 2003	0
S2	Furutani-Seiki M, et al, Mech Dev, 121, 629-637, 2004 (メダカ特集号)	40
S3	Henrich T, et al, Mech Dev, 121, 959-963, 2004 (メダカ特集号)	5
S4	Schartl M, et al, Method Cell Biol, 77, 173-199, 2004	4
S5	Hayashi T, et al, Dev Growth Diff, 50, 279-287, 2008	0

S1 はメダカゲノムシンポジウムの Meeting Report、S2 はメダカとゼブラフィッシュを比較した総説、S3 は Genetic Screen Database(GSD)のテクニカルレポート、S4 は MGI に関する総説、S5 はイモリのレンズ再生に関する総説である。

(6) ERATO 関連の論文(総説、テクニカルレポートを含む)発表件数の年次推移をテーマ別に分類して(図 11)に示した。

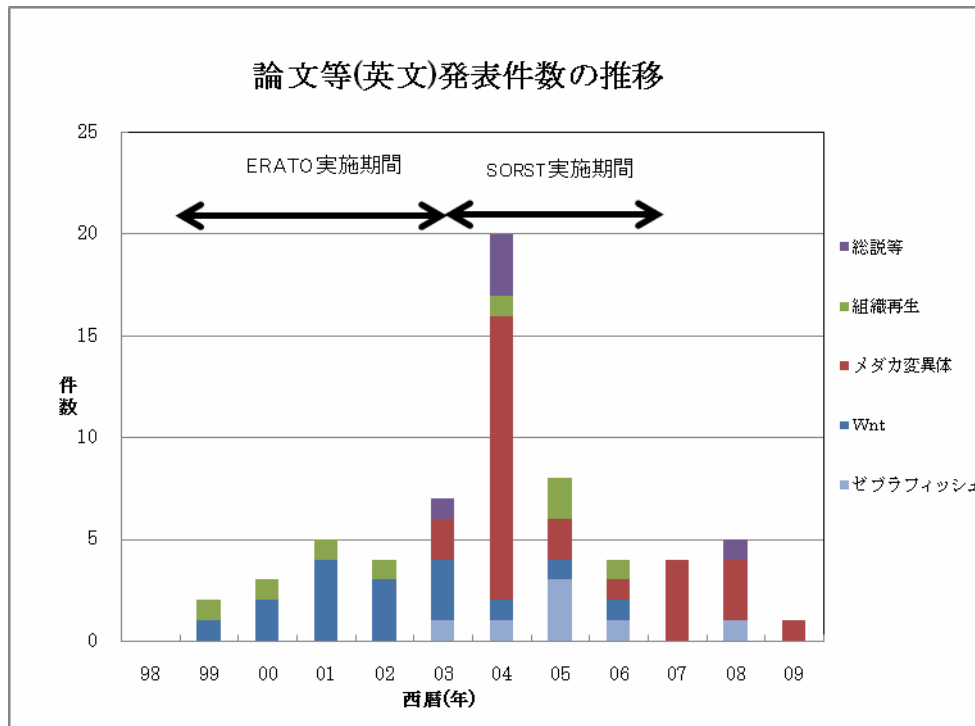


図 11 ERATO 関連論文発表件数の年次推移

(7) それらの論文の中で、主要なものについてその被引用件数の年次推移(累積)を Web of Science のデータベースで調べて(図 12)、(図 13)に示した(2008 年までの値)。

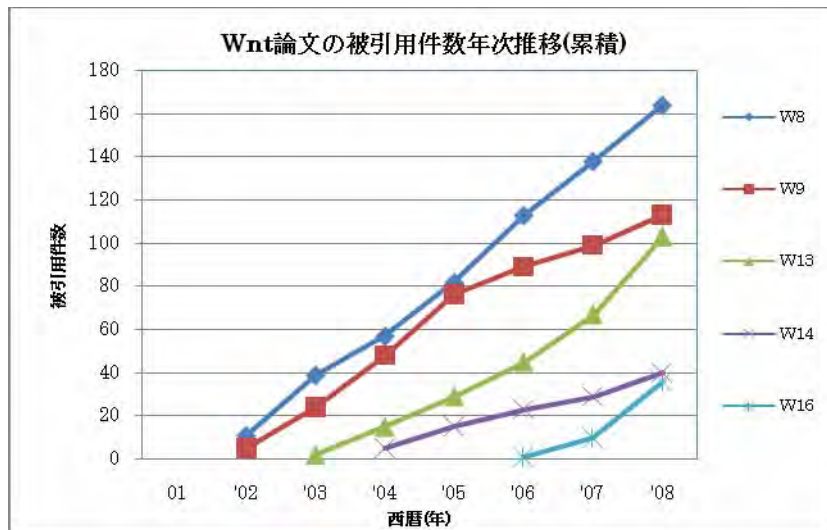


図 12 Wnt 関連主要論文の被引用件数年次推移 (累積)
 (検索日 2009/2/3 Web of Science)
 (注)Wnt の主要論文の被引用件数、番号は(表 3)の番号に対応している

高田チームの Wnt 関連論文はこの他にも被引用件数の高いものがあるが、この 5 つを代表的なものとして取り上げた。不飽和脂肪酸側鎖に関する W16 の論文はまだ新しいが注目されている様子がうかがえる。



図 13 Wnt 以外の主要論文の被引用件数年次推移 (累積)
 (検索日 2009/2/3 Web of Science)
 (注)Wnt 以外の主要論文の被引用件数、番号は(表 4)~(表 7)の番号に対応している

M4 はメダカ変異体スクリーニングの論文、L2 はゼブラフィッシュ変異体とレンズ再生の論文、S2 はメダカとゼブラフィッシュ比較の総説、Z5 はゼブラフィッシュ体節形成機構の論文、Z4 は her13.2 の論文、Z3 は Ripply の論文、M21 は性決定モデル hotei

の論文である。L2 以外は 2004 年以降の新しい論文である。

2.2 プロジェクトメンバーの活動状況

分子シグナルグループのリーダーを務めた高田慎治は、ERATO 終了後、岡崎統合バイオサイエンスセンターの教授に就任し、高田律子とともに Wnt 関連の研究を発展させ、日本の Wnt 研究のリーダーとして活躍している。

また、同時に基礎生物学研究所に移籍した越田澄人は高田慎治と共にゼブラフィッシュの変異体を用いた研究を発展させた。その後、東京大学大学院理学系研究科の准教授に就任している。

分化変異グループのリーダーであった清木誠は、ERATO に参加する前は、平成 9 年度さきがけ研究 (PRESTO) 「素過程と連携」(大島泰治研究総括)の第一期生として、ゼブラフィッシュを用いた「脊椎動物の新しい神経系形態形成遺伝子の同定」の研究を行っていた。その当時、日本ではゼブラフィッシュを大規模に飼育する設備がなかったためこの研究はドイツで行われていた。清木は、この経験を生かして ERATO ではゼブラフィッシュやメダカの大規模な飼育設備の設計や変異体スクリーニングに貢献した。ERATO のあと SORST において研究を継続し、それが終了した後、英国 Bath 大学の生物・生化学部門に移籍し、現在は発生生物学のリーダーとして活躍している。

笹戸隆雄は、SORST 終了後、岡崎の基礎生物学研究所に移籍し、成瀬清准教授のもとで NBRP「メダカ」のキーマンとして、近藤プロジェクトから移管された設備と変異体の管理及びそのデータベース整備に活躍している。

蘇峰(Su Fu)は、SORST 終了後カナダに渡航し、Bioinformatician としてプロジェクトでの経験を生かしている。

分化遷移グループの水野伸彦は、ERATO 終了後大阪大学で近藤のもとで ERATO の成果を更に発展させた。現在では、兵庫県立大学渡辺研究室の研究者として、両生類の水晶体再生の研究に復帰している。

分化シグナルグループの技術員、土方博子は、京都大学ウイルス研究所で技術補助員として活躍している。

分化変異グループの技術員、丹羽勝利は、博士号を有しているが、名古屋大学でのメダカの飼育経験を生かして、近藤プロジェクトでは研究者ではなく技術員としてメダカやゼブラフィッシュの飼育管理のリーダーを務めた。SORST 終了後、東京農業大学動物発生工学研究室河野友宏教授のもとで研究者としてマウスの核移植の研究に従事して

いたが、その後の異動先は不明である。

岡本康子は、大阪大学大学院医学系研究科の非常勤職員としてメダカ系統の飼育・維持管理に従事している。

向田靖子は、理化学研究所発生・再生科学総合研究センター（CDB）の体軸形成研究チームの技術スタッフとしてゼブラフィッシュ系統の飼育・維持管理を担当している。

西村恵美子は、秋田県立男鹿水族館の職員としてハタハタの人工授精などの仕事に従事している。

それぞれ近藤プロジェクトで習得した飼育管理の技術を生かして活躍している。

分化遷移グループの技術員、上田陽子は、奈良女子大学理学部生物科学科荒木正介教授のもとで非常勤講師として、ERATO で作製に成功したトランスジェニックイモリの技術を生かして、網膜再生の研究に従事している。

第3章 プロジェクト成果の波及と展望

3.1 科学技術への波及

(1) 脊椎動物の体節形成に関する新しい発見の波及効果

体節間にしっかりした境界が形成されるためにフィブロネクチンとインテグリン α 5が必要で、インテグリン α 5を足場にしてフィブロネクチンが集積することによって上皮細胞が極性を持ち、体節境界が維持されることを初めて示した。

PSMで、新しく発見したher13.2という転写制御因子が、FGF濃度と分節形成を制御する時計の動きを制御するのに重要な働きをしていることを示し、これまでメカニズムが不明であったFGFの濃度変化と体節形成の時計の動きの制御機構に新しい解釈を与えた。

PSMから体節にかけて“さざ波”のようなパターンで発現するRipplyという新しい遺伝子を発見し、この遺伝子が分節遺伝子の発現を終結させる働きをしていることを示した。

これらの発見は、これまであまり分かっていなかった周期的な体節構造の形成過程に新しい解釈を与える成果であり、今後の発生生物学分野の研究の進展に貢献するものである。

(2) Wnt シグナル伝達系に関する新しい発見の波及効果

パルミトレイン酸という特殊な不飽和脂肪酸がWntに付加しており、これがないとWntは細胞外へ分泌されないことを世界で初めて発見した。これによって、これまで不明な点が多かったWntの分泌メカニズムの理解に貢献した。

発生、再生、がん化など幅広い生命現象の様々な局面においてWnt、BMP、FGF、といった分泌性のシグナルタンパク質が重要な働きをしている。今回の研究成果は、それらの分泌性タンパク質の根底をなす分子メカニズムの解明に新しい指針を示した。

(3) メダカの大規模な突然変異体スクリーニングの波及効果

小型硬骨魚類であるメダカとゼブラフィッシュは、近年新しい脊椎動物の実験モデルとして注目を集めている。それは、変異体の体系的なスクリーニングのような遺伝学的解釈と、生きた個体で単細胞レベルでの解析の両方ができるという、従来の脊椎動物の

モデル実験系にはない特徴をもつためである²⁷。

ゼブラフィッシュは、小型魚類の代表的なバイオリソースとして、特に欧米の研究者の間で広く活用されており、ゼブラフィッシュの研究成果を集積した統合データベースは”ZFIN”という名称で公開されている⁴¹。その内容と利用方法に関する日本語の解説が ERATO 研究員の蘇峰らによって書かれている⁴²。

一方、メダカは、日本、中国、韓国、台湾を中心に、東南アジアに広く分布する小型他淡水魚であり、1921年に會田龍雄によって初めて限性遺伝の存在が報告されて以来、90年近い研究の歴史から日本には豊富な基礎データが集積されている。

メダカは温帯域の魚であるので、低温耐性を持ち、温度感受性変異体の同定が出来、エアレーションのない小さな水槽で簡単に飼育して次世代を得ることが出来という、実験動物としての大きなメリットを持っている。また、ゲノムサイズも約 800Mbp とゼブラフィッシュの半分程度であり、調節領域の同定や遺伝子導入個体の作製に有利である⁴³。

しかし、メダカの世界적인認知度はゼブラフィッシュに比べて低い。そのことが、論文数にも表れている。ゼブラフィッシュとメダカの 1990 年以降の論文数の推移を比較して (図 14)に示した。

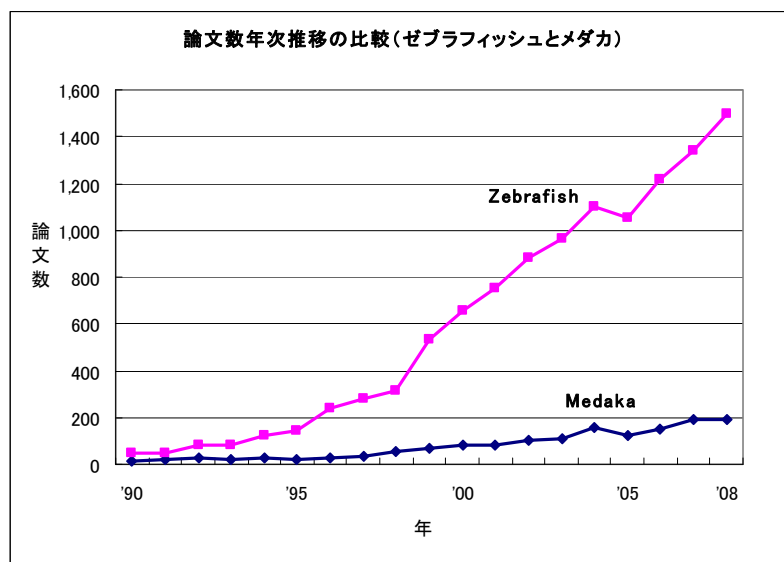


図 14 論文数年次推移の比較 (検索日 2009/2/2 PubMed)

(注) Title, Abstract 中に「Zebrafish」と「Medaka」という単語のある論文数

⁴¹ <http://zfin.org/>

⁴² 蘇峰、古谷・清木誠、細胞工学 25, 944-949, 2006

⁴³ 成瀬清 総研大ジャーナル 13号,2-7, 2008

メダカとゼブラフィッシュの比較については清木らにより総説が書かれている⁴⁴。また、近藤らによる日本語の総説の中でもその比較がされている⁴⁵。（表 8）にその比較表を示した。

表 8 メダカとゼブラフィッシュの比較 (近藤寿人らの総説より転載)⁴⁵

特徴	メダカ	ゼブラフィッシュ
原産地	日本	インド
世代時間 (卵から成長して、次の世代の受精卵を作るまで)	10週程度	12週程度
性決定	ヒトと同じようにXY染色体によって決まる。	飼育条件に依存して変わるらしい。
産卵	一つがいの雌雄をつくると、毎日30個ほど、数週間にわたって産卵を続ける。	交尾により一度に数百個の卵を産みおとす。
採卵	雌が受精卵を腹につけているのでそれをしごき取る。	底面に沈んだ受精卵を集める。隔離せずに放置すると親が食べてしまう。
染色体数	n=24	n=25
ゲノムの大きさ (全塩基配列数)	ヒトの約1/4 (8億塩基)	ヒトの約1/2 (17億塩基)
反復配列	少ない	多い
遺伝的多型の頻度	高い (100塩基あたり1個)	低い (1,000塩基あたり1個)
純系系統	数系統	なし
全ゲノム塩基配列決定	進行中	進行中
大規模突然変異体スクリーニング	実施	実施
温度感受性変異体	突然変異体の約15%	低頻度 (熱帯魚であるので温度幅に限度)
精子の凍結保存 (たくさんの突然変異体系統のバックアップに用いる。TILLINGに必須)	良好で確実	可能 (いまだ確実性に不足がある)

(注) この表では、メダカの全ゲノム塩基配列決定は、「進行中」となっているが、既に完了しその結果が2007年のNatureに発表されている⁷。ゼブラフィッシュではメダカより早くから検討されているが未だにその結果が出ていない。

ゼブラフィッシュからは沢山の突然変異体が得られ、90%以上の遺伝子について突然変異が誘起されたものと推定されている。しかし、遺伝子群による機能重複が原因で突然変異体が表現型を示さない場合も多い。

実際ゼブラフィッシュでは、発生生物学的観点から重要な脳形成に関する突然変異体は少数(14種)しか得られていない。この弱点は、動物種を変えることでかなり克服されることから、メダカの変異体の大規模スクリーニングの成果は大きな意義を持つ。その証拠として、ゼブラフィッシュで得られなかった脳形成に関する変異体がメダカでは52種得られており、その解析から新しい知見が多く得られている。

ゲノム情報と変異体情報は相補って今後の研究に寄与するものであり、今回の近藤プロジェクトにおける、世界で初めての大規模なメダカの突然変異体スクリーニングの成果が加わることによって、変異体のリソースを充実させると共に、その飼育管理システムとノウハウを日本に定着させ、日本独自のバイオリソースとして「メダカ」を世界に発信できる基盤整備がさらに進展したといえる。

また、本年(2009年)には、Wiley-Blackwell社から、約400ページの“A Laboratory

⁴⁴ Furutani-Seiki M, Wittbrodt J, Mech Dev 121, 629-637, 2004,

⁴⁵ 近藤寿人、清木誠、Molecular Medicine 41, 182-188, 2004

Manual for MEDAKA BIOLOGY” が刊行され、実験動物としてのメダカの国際化に貢献している。執筆者を若手に限定した本書の上梓に、近藤プロジェクトの参加メンバー達が執筆者・編集者として中心的な役割を果たしており、データも本プロジェクトのものが多数使われている。

(4) 生殖細胞の増殖と性分化に関する新しい発見の波及効果

今回得られたメダカの突然変異体を用いた基礎科学的成果の一つに、本プロジェクトが基礎生物学研究所の田中実と共同で行った、性決定における生殖細胞の役割の解明がある。

性転換は動物によってしばしば認められる現象であるが、そのメカニズムはこれまで解明されていなかった。また、生殖細胞の数がどのように制御されているかも明らかにされていなかった。この共同研究で、生殖細胞の数の制御が性分化・性転換に関係していることを初めて示した。また、哺乳類で既に知られている生殖腺付属器官が雌雄それぞれの付属器官に発達するために必須の遺伝子ホモログが、メダカでも生殖細胞の発達と性分化に関与することを発見した。

これにより、同定された遺伝子が哺乳類特有の機能だけでなく、魚類からヒトに至るまで動物の間で広く共通の生殖腺形成と性分化の機能を持つ重要な遺伝子であることが予想され、これまで明らかにされていなかった動物の性分化のメカニズムの解明につながるカギとなりうる⁴⁶。

(5) 両生類の組織再生と分化遷移に関する新しい知見の波及効果⁴⁷

イモリのレンズや網膜の再生実験は誰がやっても再現性が高く、現象的には非常に明確であるが、その分子生物学的な再生機構は分かっていない。それは、イモリのゲノムサイズがヒトの 40 倍と大きく、ゲノムに不要な部分が多いために遺伝学的な複雑さから分子生物学的アプローチがとりにくい点にある。

近藤プロジェクトでは、イモリの組織再生に再生シグナルカスケードが働いており、その中で **FGF2** が重要な役割を果たしていることを解明し、次のステップとして **Wnt** シグナルとの関係を明らかにし、イモリの組織再生分野の分子生物学的アプローチに先鞭をつけた。

また、イモリに遺伝子導入をしてトランスジェニックイモリを作製したことはこのプロジェクトの大きな成果であり、今後、継代飼育に成功してトランスジェニック体が大量に供給できるようになれば、この分野の研究に貢献する。

⁴⁶ 科学技術振興機構(JST)、基礎生物学研究所 (NIBB) 共同発表 (平成 19 年 5 月 29 日)

⁴⁷ 奈良女子大学理学部生物科学科 荒木正介教授談

3.2 社会経済への波及

(1) メダカの飼育管理法および発生 of 仕組みの理解に対する貢献

本プロジェクトで開発されたメダカの飼育管理システムは、使用する水、餌の調製方法、病気の処置方法など、細かい飼育ノウハウを含めてマニュアル化され、飼育装置とともに基礎生物学研究所に引き継がれ活用されている。

本プロジェクトの内容について、科学技術振興事業団で近藤誘導分化プロジェクト・ビデオ記録「生命が形をつくるとき」が作成されているが⁴⁸、その中でメダカおよびゼブラフィッシュの大規模飼育管理の様子が、水の処理や温度管理の方法、餌の調製方法、授精のさせ方、受精卵の取扱い方法、メダカの初期発生 of 仕組みなど、分かりやすく映像化され紹介されていて、学校等における教育資料としても利用できる。また、CD化された英語版は国際学会などを通じて世界的に広く知られることとなり、研究資源としてのメダカの評価に大きく貢献している。

(2) 精子保存技術の確立と普及

本プロジェクトで開発された精子保存技術は、その後の検討で解凍時に100%元に戻せることが確認されたので、基礎生物学研究所のNBRP「メダカ」の種の保存に実用化され、現在は全てこの方法で変異体が保存されている³³。

外部から変異体の提供依頼があると、Material Transfer Agreement(MTA)を取り交わして、必要とする系統の凍結精子を使って人工授精し、通常は胚の形で研究者に送付する。メダカは成魚でも比較的強いので、ペットボトルの中に入れ気層を酸素で置換して国際宅急便で送付する場合もある。

この精子保存技術はNBRP「メダカ」の「ラボマニュアル」⁴⁹に“精子凍結(Sperm Freezing)マニュアル”および“人工授精(Artificial Insemination)マニュアル”として収録されている。

またその内容は、英文版「Medaka Book」³⁴に収録され、3.3.1 Cryo-preservation of Medaka sperm、および、3.3.3 Artificial insemination using frozen sperm、として海外の研究者にも公開されている。

(3) メダカ変異体の充実による医療分野への波及効果

⁴⁸ 「生命が形をつくるとき」 <http://www.jst.go.jp/erato/video/1998.htm#4>

⁴⁹ 「ラボマニュアル」 <http://www.shigen.nig.ac.jp/medaka/strain/sperm.jsp#sperm>

メダカ変異体の網羅的スクリーニングにより、不足していたメダカ変異体の基礎データを充実させ、NBRP「メダカ」に登録して公開した。また、その成果を論文等で発表することで、日本独自のバイオリソースとして、メダカの国際的認知度を高めることにも貢献した。

ゼブラフィッシュでは、野生種および変異体の胚や成魚が、既に新薬開発における化合物の薬効・安全性の一次スクリーニングモデルとして広く利用されており、それに関する総説も書かれている^{50,51,52,53}。

これらの総説によると、薬効・安全性評価のモデル動物としてのゼブラフィッシュの利点は、①初期発生の胚を用いることで、少量のサンプルで、短時間に、簡便に、多数の化合物の *in vivo* スクリーニングができること、②ゼブラフィッシュの成魚は透明であるために内臓が外部から直接観察でき、化合物の影響が目で確かめられること(特に心血管系の毒性評価に有用)、③表現型(Phenotype)の解析されている変異体が多数あり、病態モデルとして利用できること、④これまでの多くの研究結果から、化合物に対する薬効や毒性に関するレスポンスがゼブラフィッシュとヒトで類似していることが分かってきたためとされている。例えば、化学品に対するゼブラフィッシュの LC₅₀ は哺乳類の急性毒性と相関しており、また、ゼブラフィッシュの胚を用いた心血管系の毒性スペクトルは、ヒトで確かめられているものと類似している。

変異体の利用に関して、上記③について詳述する。遺伝子の表現型が分かっている変異体を用いると、特定の疾患の発症経路に対する薬物の作用を直接評価でき、特に有用であるといわれている⁵¹。また、変異体は発癌、放射線に対する影響を調べるモデルや、その他の病態モデルとしても利用されている⁵³。例えば、癌抑制遺伝子 TP53 はヒトの癌で最も多く変異がみられる遺伝子の一つとして知られているが、ゼブラフィッシュの TP53 変異体を用いてその作用機作や化合物の薬効評価の検討も行われている⁵³。また、ゼブラフィッシュの変異体を用いてアセチルコリン・エステラーゼ(AChE)阻害剤の評価を行った研究も報告されている⁵⁴。

メダカについても、NBRP に寄せられるメダカの変異体に対するサンプル提供依頼は、発生物学分野の基礎研究よりもむしろ心臓・肺・肝臓といった特定臓器分野の研究者からの依頼が多いといわれており³³、ゼブラフィッシュと同様に、これらを用いた研究成果が今後蓄積されることによって、医療分野の発展に貢献できよう。

⁵⁰ Zon L.I, Peterson R,T Nature Reviews Drug Discovery 4, 35-44, 2005

⁵¹ den Hertog J, Bioscience Reports 25, 289-297, 2005

⁵² Rubinstein A.L, Expert Opin Drug Metab Toxicol 2,231-240, 2006

⁵³ Kari G,et al, Clinical Pharmacology & Therapeutics 82, 70-80, 2007

⁵⁴ Behra M,etal, Toxicological Science 77, 325-333, 2004

米国 FDA では、臨床試験に入る前に、候補化合物の脱落率が 10%改善されると、新薬あたりの開発コストが 1 億ドル改善されるという試算もされていて、その為の新しい動物モデルが求められており、ゼブラフィッシュはこの面でも注目されている⁵⁰。

これまで、マウス、ラットなどで行われてきた医薬品のスクリーニングや応用・開発研究の全てがこのような小型魚で置き換えられるというわけではないが、その一部が、より小型のメダカやゼブラフィッシュで代替されるようになれば、研究期間の短縮、研究費用の低減にも貢献する。

(4) 化学物質の安全性評価および環境評価への利用

2006 年に EU で REACH(Registration, Evaluation, Authorization and Restriction of Chemicals)という化学物質の登録、評価、認可および制限に関する規則が成立した⁵⁵。この中で、国際間の化学品の輸出入にあたって、その環境に対する影響を評価するために、メダカやゼブラフィッシュなどの魚類を使って急性毒性、慢性毒性などの試験を義務付けている。

この場合でも、どこかに点変異を導入した変異体の方が感度良く影響が出る。カスケードのどこが影響しているのかを調べる目的でも変異体が利用される⁵⁶。

また、純系のメダカと変異体とを比較して化学物質のホルモン分泌に対する影響などを研究することは、環境汚染問題解決の糸口となる。

ゼブラフィッシュの環境毒性評価への利用については、Scholz S らの最近の総説⁵⁷によくまとめられており、REACH で要求されている化学品、殺虫剤、殺菌剤、医薬品の環境アセスメントや、排水のルーティンテストにおけるゼブラフィッシュの利用法について詳しく解説されている。その内容の一部を以下に紹介する。

ドイツの環境庁は Fish Embryo Test (FET)のガイドラインを作成して OECD に提出しており、これが承認されると、FET が環境アセスメントに広く活用されるようになる。

ゼブラフィッシュの胚が最近特に注目されている一つの理由は、魚の胚は最近の動物愛護の規制対象にならないことであり、小規模で効率よく評価ができるために、化学物質のリスクアセスメントのモデルとして特に魅力的だといわれている。

ゼブラフィッシュの胚を用いて、環境評価をする場合、発生致死の割合から急性毒性や催奇性を短時間で評価できるだけでなく、現在検討されている、トキシコキネティック

⁵⁵ 環境省 “化学物質をめぐる国際潮流について” <http://www.env.go.jp/chemi/reach/index.html>

⁵⁶ 京都大学大学院農学研究科 木下政人助教談

⁵⁷ Scholz S, et al, Environ Sci Polut Res Int 15(5), 394-404, 2008

ス(Toxicokinetics)、トキシコダイナミクス (Toxicodynamics)、免疫調節(Immune modulation)、遺伝毒性 (Genotoxicity)の研究が進むことによって、急性毒性や催奇性の作用機作を推定したり、さらには、慢性毒性、免疫系に対する影響、癌原性、生殖機能への影響を予測することが可能になるといわれている。

(5) ゼブラフィッシュとメダカの特徴を生かした応用分野と国際協力関係

ゼブラフィッシュでは既に海外で医療分野や安全性評価・環境評価への応用の試みがビジネスとして行われている。例えば、米国の Phylonix 社は、ゼブラフィッシュを用いた *in vivo* の薬物スクリーニングシステムを開発し、薬物の安全性評価や、癌、中枢神経系、心血管系などの治療薬の一次スクリーニング、米国環境保護局 (EPA) の毒性評価試験や、NIH の国立眼研究所(NEI)の治療薬スクリーニングを受注している⁵⁸。

ゼブラフィッシュは熱帯魚であるために低温に対する耐性がなく、戸外で飼育して直接水質などの環境評価を行うには限界があるが、メダカは温度適用範囲が広いために、屋外における排水等のルーティンテストの優れたモデル動物であるといえる⁵⁶。また、メダカではゼブラフィッシュでは得られていない脳神経関連の変異体が多く得られており、新しい利用法が期待出来る。また、ゼブラフィッシュには純系系統を持たないという難点があり、データの再現性確保のためには、評価試験で多数の動物が必要となる。確立された純系系統を擁するメダカが、ゼブラフィッシュの欠点を補うすぐれた実験動物としての評価を得つつある。

このように、ゼブラフィッシュで既に行われているようなことが、今後メダカでも行われると同時に、それぞれの特徴を生かした使い方で、相互補完的に社会に貢献すると考えられる。

Medaka Genome Initiative(MGI)設立の歴史にも述べられているように¹²、MGI は、すでに先を進んでいる欧米のゼブラフィッシュの研究者と日本のメダカの研究者が、資源、未発表データ、アイデア等を相互に交換しあうことで、メダカをゼブラフィッシュに次ぐモデル動物に育てようと計画されたものである。今後このような国際協力の波及効果が期待される。

⁵⁸ Phylonix 社のホームページ、<http://www.phylonix.com/>