

研究課題別 事後評価結果

1. **研究課題名:** 小型魚突然変異体群を用いた脳領域発生の研究

2. **研究代表者:** 近藤 寿人 (大阪大学 大学院生命機能研究科 教授)

3. 研究内容及び成果

本研究は、これまでの研究で作製したメダカの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を目指した。

神経系に直接に関わる突然変異体および発生生物学的に重要と思われる突然変異体の研究を進めた。また、突然変異体の保存に重要な、簡便で再生率が高く安定した精子凍結保存技術の完成と応用、突然変異体の分析を補助するRadiation Hybrid(RH)パネルの作製、網羅的な突然変異体作製法の試行等を行い、メダカ突然変異体の解析を通して発生遺伝学的な研究方法とそのツールの開発を行った。

その結果、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、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た。原因遺伝子の確定は、多型マーカーを用いた染色体歩行による染色体座の特定、候補遺伝子のコード領域の塩基配列上の変異の同定、変異遺伝子の機能的な確認に基づいてなされた。上記8種類の突然変異体に関しては、原因遺伝子の同定に止まらず、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することが出来た。

具体的な成果を次に示す。

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研究

*otafuku*突然変異体の研究

遺伝子座LG10にマップされた*otafuku(ota)*変異体の原因遺伝子に関し、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*遺伝子が分泌性タンパク質であるWnt8をコードすることを明らかにした。また、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大きな貢献をした。

*hirame, fukuwara*突然変異体の研究

*hirame(hir)*と*fukuwarai(fku)*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。

*hir*変異体では神経胚後期から胚体全体が扁平になる。*fku*変異体では、神経胚初期より主に神経上皮に強い変形が起るため、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。

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 *kazura*, *yanagi* 突然変異体の研究

kazura(*kaz*), *yanagi*(*yan*)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に同時に異常を示した。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。*kaz*, *yan*両突然変異は、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をコードすることが明らかになった。CXCR4bが始原生殖細胞の移動の制御に関わることは示されていたが、RDC1の関与は全く新しい知見である。

3) 生殖細胞の増殖と性分化に異常を示す *hotei* 突然変異体の研究

hotei(*hot*)突然変異体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

この *hot* 変異の原因遺伝子がAMH (anti-Muellerian hormone) type receptorであることが同定された。これまで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ー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極めて大きい。

4) 鰭を欠失したメダカ突然変異体 (*finless*) の研究

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であるEDARADD遺伝子に対応するメダカ遺伝子であると考えられた。

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

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。

6) メダカ精子の凍結保存法の改良

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、特に凍結手順を簡略化すると共に再現性を向上させた。また、技術の普及に努めた。

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Radiation hybrid(RH)パネルを作製し、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LG7, 12, 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。また、精子凍結技術の確立と、メダカの突然変異体作成に関する経験を生かして、メダカ突然変異体のTILLINGライブラリを作製した。

以上のように、研究代表者らは、メダカの突然変異体を網羅的に単離、収集した。発生過程における脳領域の形成機構の解明に役立つような変異体や、生殖細胞の増殖と性分化に関する変異体に注目したことが特色である。その中には遺伝子を確定したものも多くあり、一定の成果を上げた。さらには、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成果を出した意義は大きく、特筆出来る。

4. 事後評価結果

4 - 1. 外部発表(論文、口頭発表等)、特許、研究を通じての新たな知見の取得等の研究成果の状況

PNASをはじめとする海外の学術誌に、多数の論文を発表した。また、国内外で多数の招待講演等があり、特に研究代表者が2004年にCold Spring Harbor Laboratory 2004 Meeting on "Evolution of Developmental Diversity"(New York, USA)で行った招待講演「Medaka fish and their mutants」が、Science誌において同meetingの注目講演として取り上げられ紹介される等、精力的な外部発表を行っており、評価出来る。

特許の出願はないが、系統保存をきちんと行っており生物遺伝学的資源としての価値は高く、メダカ研究の基盤作りへの貢献は大きい。

4 - 2. 成果の戦略目標・科学技術への貢献

脳領域の形成・維持に関する突然変異体の作出等、多くの発生異常の突然変異体を得たことは、今後これらを実験材料に活用し脳形成機構に関する研究の進展に貢献するものである。また、技術的な側面での貢献としては、精子の凍結保存法の改良やメダカ染色体のRHパネルの作製が挙げられる。本研究で獲得したメダカ突然変異体の生物遺伝学的資源は、今後のメダカ生物学の発展に大きく寄与するものである。

4 - 3. その他の特記事項(受賞歴等)

なし