



# メダカを使った解析パイプライン

～ヒト疾患モデルとしてのメダカ：コンディショナル KO などを使った多面的解析系の確立～

日時 2014年 3月8日（土）

場所 岡崎コンファレンスセンター（当日参加歓迎・無料）

近年、次世代シーケンサーにより新規にゲノム解析が可能となり、モデル生物と非モデル生物の区分が無くなりつつあります。しかし、生物種ごとの実験・研究手法の確立はまだ格差があり、その点ではモデル生物を使うメリットは十分にあります。一方で、動物愛護の観点からマウスの利用に制限が増えつつある現状、第2の脊椎動物モデルが求められています。メダカは十分にそのポテンシャルがあると考えられます。本重点共同利用研究ではメダカを疾患研究に耐えうるモデル動物とするため、新技術・オリジナル技術を含めた基盤を整えてきました。それぞれのメダカ研究者が持つ基盤技術・リソースそしてノウハウを繋ぐパイプラインをメダカ研究の中心的存在である基礎生物学研究所をハブにして構築中です。このパイプラインによるサポートがメダカによる疾患モデル研究がスムーズに進めることが可能になると期待しています。本シンポジウムではこれまでに整えた技術基盤ならびに研究例の紹介をします。

## <<プログラム>>

- 9:00～ 9:10 はじめに 重点共同利用研究代表者 谷口善仁
- 9:10～ 9:30 ゲノム編集技術を用いたメダカの遺伝子破壊--ヒト疾患モデルを目指して--  
京都大学農学研究科 木下政人
- 9:30～ 9:50 突然変異によって疾患モデルを作る：TILLING法  
慶應義塾大学医学部 衛生学公衆衛生学 谷口善仁
- 9:50～10:10 メダカの細胞の遺伝子発現を光で操作する：局所遺伝子発現法（IR-LEGO）  
基礎生物学研究所 生物機能解析センター 光学解析室 亀井保博
- 10:10～10:30 色素細胞をモデルとした細胞運命決定機構の解析  
名古屋大学 生物機能開発利用研究センター 橋本寿史
- ～Break～
- 10:50～11:10 神経線維腫症 I 型(NF1)モデルメダカ ー新しい治療法への架け橋ー  
慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 遺伝子制御 國仲慎治
- 11:10～11:30 レプチン受容体欠損メダカで糖尿病の疾患モデル確立へ  
水産総合研究センター 増養殖研究所 荻田（ちさだ）慎一
- 11:30～11:50 量的形質の遺伝学的解析～メダカにおける解析系構築の試み～  
国立遺伝学研究所 系統生物研究センター 小型魚類開発研究室 新屋みのり
- 11:50～12:10 動きと組織切片像の数値化によるメダカの全部の研究  
東京大学大学院新領域創成科学研究科 尾田正二

課題代表者：谷口善仁 所内対応者：亀井保博

## 要旨

---

### ゲノム編集技術を用いたメダカの遺伝子破壊--ヒト疾患モデルを目指して--

京都大学農学研究科 木下政人

この数年の間に、Zinc finger nucleases (ZFNs), Transcription Activator-Like Effector Nucleases (TALENs), the CRISPR/Cas system などの Engineered Nuclease を用いたゲノム編集技術が急速に進展した。この技術は、ES細胞が樹立できず遺伝子破壊が困難であった生物においても、狙った遺伝子の破壊を容易にした。

これら Engineered Nuclease の中で TALEN と CRISPR/Cas system について、我々がこれまでにメダカを用いて行った実験例を紹介し、これらの設計方法や遺伝子破壊の特性について述べる。また、本技術を用いてのヒト疾患モデルメダカ作出について展望する。

---

### 突然変異によって疾患モデルを作る：TILLING 法

慶應義塾大学医学部 衛生学公衆衛生学 谷口善仁

多くの疾患は遺伝子異常がその根底にあることが知られており、ヒトにおける数々の「疾患原因遺伝子」あるいは「疾患関連遺伝子変異」は、米国国立生物工学情報センター (NCBI) の OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) などのデータベースで閲覧することができる。

メダカは DNA アルキル化剤である N-エチル-N-ニトロソウレアによって、ゲノム上にランダムに点突然変異を誘発させることができる。我々が作製した変異メダカライブラリー (凍結精子と、それに対応する変異ゲノムから成る) は、350kb に一つの変異密度を持つと推定され、6,000 尾の変異メダカを対象に点変異を探索すれば、60 塩基に 1 つの点変異が見つかる計算となる。

最近では、遺伝子改変の方法として、木下が紹介する TALEN や CRISPR/cas9 といった新技術の台頭により、TILLING の意味合いもかなり変化してきた。講演では、基生研での HRM による変異探索システム、TILLING により作製された変異体メダカの実例、および、TILLING の今後の展望について紹介する。

---

## メダカの細胞の遺伝子発現を光で操作する：局所遺伝子発現法 (IR-LEGO)

自然科学研究機構 基礎生物学研究所 生物機能解析センター 光学解析室 亀井保博

イメージングつまり、「見る」ことが医学・生物学分野で最盛の時代である。顕微鏡はそもそもミクロの世界を見るために開発され、見えないものも、抗体、相補核酸、あるいは、偏光、位相差、蛍光で可視化し、レーザーの出現により切らずとも光学切片画像が取得でき3次元構築が可能になった。さらには GFP (緑色蛍光タンパク質) の出現により「ライブイメージング」が可能となり生体内の分子や細胞の動態観察、カルシウムなど生理状態の定量化も可能となった。次に求められる技術は、「見る」から「操作する」へのシフトであろう。最近、オプトジェネティクスとよばれる光操作法が注目されている。遺伝的に光イオンチャンネル/ポンプ分子を発現させ、光を使って膜電位を操作して神経細胞の活性化/不活化を制御することができる。今回はオプトジェネティクスとは別の「光による細胞操作」法を紹介する。熱ショック応答を利用し、生体内の狙った細胞に局所的に遺伝子発現誘導を行える手法で、サーモジェネティクスと呼ばれる技術に含められるのだろう。赤外光を照射することで生体内の単一細胞あるいは局所を加熱し、熱ショック応答を局所で誘導してトランスジェニックとして導入してある下流の遺伝子を ON にすることができる技術で、**Infrared Laser-Evoked Gene Operator (IR-LEGO)** : 文献 1) と名付けた。熱ショック応答自体はほぼ全ての生物が持つストレス応答反応であるため、対象となる生物種はトランスジェニック技術が確立された生物種(動・植物)と広い(文献 2)。講演では IR-LEGO の基本的技術の紹介と最近の応用例(文献 3)ならびに現在進行中の応用例を通してこの技術のポテンシャルをお伝えしたい。将来的にはメダカ疾患モデルの多面的解析の 1 つのツールとして、基礎医学への貢献できると考えている。

文献

- 1) Kamei et al. Nature Methods, 6, 79-81, (2009)
- 2) Deguchi et al. Dev. Growth Differ., 51, 769-75, (2009)
- 3) Shimada et al. Nature Communications, 4, 1639 (2013)

---

## 色素細胞をモデルとした細胞運命決定機構の解析

名古屋大学 生物機能開発利用研究センター 橋本寿史

幹細胞から多種多様な細胞種が産生される細胞分化の仕組みを理解することは発生学の中心的課題の一つであり、そこで得られる知見は幹細胞生物学や再生医学などの分野に応用可能な一般原理を導くものと期待される。

我々のグループは、メダカにおける神経堤幹細胞から色素細胞への分化をモデルとして、細胞分化過程における『運命決定』の分子メカニズムを明らかにすることを目指している。メダカは、黒、虹、黄、白色の 4 種類の色素細胞を持つが、このうち白色素胞と黄色素胞は共通の前駆細胞（黄白色素芽細胞）を経て発生することが示唆されている。我々は、黄色素胞の形成不全と白色素胞の過形成を示す *ml-3* 変異体を用いて、メダカにおける色素細胞の分化を発生遺伝学的に解析した。その結果、*Sox5* が黄白色素芽細胞から黄色素胞あるいは白色素胞への運命選択における運命決定スイッチとして機能する可能性を見出したので、本シンポジウムで紹介したい。

---

### 神経線維腫症 I 型(NF1)モデルメダカ ー新しい治療法への架け橋ー

慶應義塾大学医学部 先端医科学研究所 遺伝子制御研究部門 國仲慎治

神経線維腫症 I 型 (NF1) は人種性別に関係なく約 3000 人に 1 人の頻度で発症する常染色体優性遺伝疾患で、患者さんの半数は罹患した親からの遺伝であるが、残り半数は *de novo*、すなわち NF1 遺伝子の突然変異により生じる。突然変異を原因とした単一遺伝子疾患として NF1 は最も頻度の高いものであり、日本でも約 4 万人の患者さんの存在が推定されている。すなわち我々は気付く気付かないに関わらず NF1 と関わっている可能性がある。NF1 患者の多くは通常の日常生活を送れるが、一部の方は重度の症状を呈することがあり、重症の NF1 は厚生労働省の難病対策指定を受けている。その治療は現在のところ外科的切除を中心とした対症療法が主であり、より効果的で簡便な薬物療法の開発は患者さんの悲願であると言えよう。私達は新規治療法開発に必須であるモデル生物としてメダカの有用性に着目し、基礎生物医学研究所に寄託されたメダカ変異体ライブラリより NF1 遺伝子変異体を選び出して解析を進めている。本講演では既存モデル生物との対比を含めこの新しい NF1 モデルメダカをご紹介したい。

---

### レプチン受容体欠損メダカで糖尿病の疾患モデル確立へ

水産総合研究センター 増養殖研究所 菅田 (ちさだ) 慎一

レプチンは体のエネルギー状態を脳に知らせ、エネルギー恒常性を維持するために重要なホルモンである。それは摂餌行動、繁殖、免疫機能、エネルギー消費、糖・脂質代謝などを介して行われる。例えば、満腹の状態では、脂肪組織（魚類では肝臓）からレプチンが分泌され、視床下部にあるレプチン受容体に作用し、摂餌抑制、そしてエネルギー消費を

亢進させる。

我々の研究グループでは、養殖魚におけるレプチンシグナルの機能欠損が摂餌量増加による高成長形質をもたらすと考え、TILLING 法により作製したレプチン受容体欠損 (LepRKO) メダカの表現型解析を行った。その結果、LepRKO メダカは間脳における摂餌促進ペプチドの増加、摂餌量増加、そして高成長を示した。従って、養殖魚におけるレプチンシグナルの機能欠損は高成長形質をもたらすと期待される。

世界保健機関 (WHO) によると、糖尿病は「未治療の状態では、血糖の慢性的な上昇により特徴付けられる疾患=高血糖状態の持続」と定義される。また、2006 年の時点で世界に少なくとも 1 億 7000 万人の糖尿病患者がおり、2030 年までに倍増すると推定している。

LepRKO マウスは過食、肥満とともに高血糖状態を持続し、2 型糖尿病モデルマウスとして糖尿病研究に利用されている。LepRKO メダカも同様に空腹時高血糖、高血糖状態の持続など糖代謝異常を示した。さらに LepRKO メダカの糖尿病発症は飼育環境により制御できることが分かった。従って、メダカの飼育環境をヒトの生活習慣と捉えることで、LepRKO メダカは、糖尿病の遺伝的リスクを持ったヒトへの治療及び生活習慣改善に貢献できる新たな疾患モデルと考えている。本講演では LepRKO メダカの高成長、及び糖尿病に関わる表現型を紹介したい。

---

### 量的形質の遺伝学的解析～メダカにおける解析系構築の試み～

国立遺伝学研究所 系統生物研究センター 小型魚類開発研究室 新屋みのり

エンドウ豆の色や形といったメンデル遺伝形質 (= 単一遺伝形質) に対し、表現型が数値で表され連続的な変化を示す量的形質がある。量的形質の多くは、複数の遺伝要因と環境の両方が関与して形成される複合形質である。身長や血糖値、リウマチなどの比較的罹患率の高い遺伝性疾患は量的形質・複合形質に類しており、我々の身の回りには非常に多くの重要な量的形質が見受けられる。しかし、表現型の評価法など解析上困難な点が多く、遺伝学的な解析はあまり進んでこなかった。ところが、この 10 年程度の間コンピューター技術や数理解析手法などツールの面で目覚ましい進歩が認められ、量的形質に関わる遺伝要因の解明が現実味を帯びつつある。

小型魚類であるメダカは、遺伝的背景が均一な近交系が多数樹立されており、しかも多くの個体を扱うのが比較的容易であるなど、量的形質の解析に適した特性を持つ。我々は、このようなメダカの利点を生かし、メダカにおける量的形質解析系の構築を目指している。量的形質の中でも比較的遺伝性が高いと考えられている形態をモデルとし、これまでにメダカ近交系 2 系統を用いて統計遺伝学的解析を行ったところ、形質との関連が強く示唆されるゲノム領域を複数ヶ所特定することに成功した。現在、この候補領域から遺伝子を同



定する一連の流れを整えるべく、必要な系の構築およびその試用を進めている。本講演では、これらシステムの現状を解析結果と共にご紹介したい。

---

## 動きと組織切片像の数値化によるメダカの全部の定量化

東京大 大学院 新領域 先端生命科学 尾田正二

メダカは古くより発生学、遺伝学、生理学等の各分野において実験動物となってきた。近年、ゲノムシーケンスと個体での遺伝子操作が可能となり、遺伝子機能を個体レベルで解明するためのモデル生物としても広く注目されている。

遺伝子機能の異常は、動物個体レベルにおいてはハードである体、すなわち組織・器官の構造と、ソフトである生理的機能、すなわち個体レベルでは当該個体の動きに反映されると期待される。我々は、遺伝子機能を個体レベルで解明するモデル生物としてメダカを捉え、メダカの体（組織構造）とメダカの動きを数値化し、メダカという生き物の存在を定量的に解析・評価することを目指している。

体躯が小さなメダカの特徴を活かして、メダカの全身を組織切片として一枚のスライドグラスにのせ、細胞・組織からメダカ全身をシームレスに顕微鏡で観察している。さらに全身の連続切片を作製して、例えば連続する切片に HE 染色と免疫組織染色を施し、遺伝子操作による組織・器官構造への影響を多臓器同時に評価することを試みている。これらのメダカ全身組織切片をバーチャルスライド化によるシェアリングによって共同研究を効率化するとともに、デジタル化された組織構造を数値化・定量して、目視観察では見逃されかねない微細な構造変化をも解析・評価する技術開発を進めている。

また、近年の映像機器のデジタル化と高性能化およびパーソナルコンピュータの著しい高性能化によって、メダカの動きを高速度・高解像度のデジタル動画として記録し、得られた大容量動画データを解析することが容易になっている。メダカの様々な動き（遊泳時の体躯のうねり方、活動の概日リズム、心拍変動、瞳孔の動きなど）を撮影して数値化・分析し、メダカの視点と同じ時間分解能・空間分解能をもってメダカの動きを「観る」ことによって、メダカのソフトの部分の詳細かつ定量的な解析に挑戦している。

---

重点共同利用研究は基礎生物学研究所による 3 年間の研究費補助プログラムです。本課題は研究代表者谷口善仁（慶應義塾大学）として平成 23 年度から 25 年度の 3 年間サポートを受けました。また、本シンポジウムは基礎生物学研究所ならびに動物学会のサポートを受けて実施されています。基生研の共同利用プログラムに関しては基生研 HP（基生研共同利用で検索）または亀井保博（所内対応者）[ykamei@nibb.ac.jp](mailto:ykamei@nibb.ac.jp) までお問い合わせ下さい。