

メダカ背腹構造突然変異体 *Da* の原因遺伝子の  
ポジショナルクローニング

大塚 正人



主論文

報告番号 第 4522 号

博士学位論文

メダカ背腹構造突然変異体*Da*の原因遺伝子の  
ポジショナルクローニング

名古屋大学理学研究科生命理学専攻

大塚 正人

## 目次

要旨	1
緒言	4
第一部：メダカ遺伝的連鎖地図の作成と <i>Da</i> 遺伝子のマッピング	
緒言	11
材料及び方法	15
1. 系統及び掛け合わせ	
2. RAPDマーカー	
3. STSマーカー	
4. 既知遺伝子	
5. 遺伝的連鎖地図の作成	
6. メダカゲノムの遺伝的距離の推定	
7. 既存の連鎖地図との対応関係	
結果	27
1. マーカーとその多型性	
1-1. RAPDマーカー	
1-2. STSマーカー	
1-3. 既知遺伝子	
2. 遺伝的連鎖地図	
3. 既存の地図との対応関係	
4. 既知遺伝子のマッピング	
5. <i>Da</i> 遺伝子近傍の遺伝的地図	
考察	44



## 第二部：整列化コスミドライブラリーの作成

緒言・・ 50

材料及び方法・・ 53

1. 高分子ゲノムDNAの抽出
2. コスミドベクターの調製
3. インサートDNAの調製
4. Ligation, Packaging, Titering
5. コスミドライブラリーの整列化
6. PCRスクリーニング用DNA mixtureの調製
7. コスミドインサートDNAサイズの決定
8. コスミド末端シーケンシング
9. コスミド歩行

結果・・ 63

1. コスミドライブラリーの作成
2. コスミドライブラリーの整列化
3. PCRスクリーニング系の確立

考察・・ 69

## 第三部：*Da* 遺伝子近傍の物理的地図の作成

緒言・・ 75

材料及び方法・・ 77

1. 間期核へのfluorescent *in situ* hybridization (FISH)
2. メダカBACライブラリー
3. BACライブラリーのスクリーニング
4. BAC DNAの回収



5. BACクローンの末端シーケンス
6. BACクローンのオーダリング
7. コスミドクローンのスクリーニング
8. 染色体歩行、*Da*遺伝子を含む最小領域の決定

結果	83
1. 間期核へのfluorescent <i>in situ</i> hybridization (FISH)	
2. 染色体歩行	
3. <i>Da</i> 遺伝子を含む最小領域の決定	
4. <i>Da</i> 遺伝子近傍の塩基配列情報	
考察	90
まとめ	94
謝辞	97
引用文献	98
副論文	113



## 要旨

名古屋大学では、約80系統のメダカ自然発生突然変異体が系統維持されている。その中で*Da*変異体は、背鰭が尻鰭様の形態をし、通常腹側にしか存在しない色素細胞が背側に見られるなど、胴部、尾部において背側が腹側の鏡像対称の表現型を示す突然変異体である。これらの表現型は体節完成期頃から現れることから、*Da*変異体では個体発生の途中で胴部、尾部の背腹構造の形成に関与する何らかの遺伝子に変異しているものと考えられる。近年大規模な変異体のスクリーニングが行われたゼブラフィッシュを含め、他の脊椎動物のいずれを検索しても、同様の表現型を示す変異体の報告は今までにない。また、他の動物種において単離されている背腹構造の形成に関わる遺伝子からは、*Da*変異を引き起こす遺伝子がどのようなものであるか一概には決定できず、新規遺伝子の変異である可能性も高い。従って、*Da*変異体は脊椎動物の背腹構造の形成機構を研究するモデルとして貴重な材料になると考えられ、原因遺伝子の同定が望まれていた。

これまでに、*Da*変異体の形態的な側面からの解析は行われたが、分子生物学的手法を用いた解析は皆無であった。近年、ヒトや他のモデル生物のゲノムプロジェクトの進行にともない、パルスフィールドゲル電気泳動や、YAC (yeast artificial chromosome)、BAC (bacterial artificial chromosome)、PAC (P1-derived artificial chromosome)、cosmidベクターなどの巨大DNA断片を扱う技術が開発、改良されてきた。我々はこれらの技術をメダカに応用し、メダカにおいては初の、ポジショナルクローニングによる原因遺伝子の単離を目指している。以下、本研究で行った内容について記述する。

### メダカ遺伝的連鎖地図の作成と*Da*遺伝子のマッピング

計156個のマーカーについて、多型を検索し、バッククロス個体における分離パターンを調べ、雌の組換えに基づくメダカ遺伝的連鎖地図を作成した。*Da*遺伝子はLG VIIIにマップされた。今回の連鎖解析から推測されたゲノム長は1,776 cMで、ハプロイドゲノムが約800 Mbであることから、メダカでは1 cMが450 kbに相当する



と考えられた。

*Da*遺伝子近傍についてはさらに高解像度でマップした。*Da*遺伝子を挟む形で両側に存在する最も近いマーカー(*stsM02-5*と*stsB07-3*)と*Da*遺伝子との遺伝的距離はそれぞれ0.32 cM、0.80 cMであった。これは物理的距離として144 kb、及び360 kbに相当するため、染色体歩行を開始するにあたり十分近い距離であると考えられた。

一方、形態形成遺伝子を含む15種類の既知遺伝子について、連鎖地図上にマッピングした結果、*shh*と*eng-2*が*Da*遺伝子から2.6 cMの位置にマップされた。ゼブラフィッシュ (LG7) やヒト (Chr7) においても、これらの遺伝子は同じ染色体上で連鎖していることから、*Da*遺伝子近傍の染色体領域が種を越えて保存されている可能性が示唆された。ゼブラフィッシュのLG7上には幾つかの形態形成遺伝子がマップされているが、特に*tbx-6*や*vn-cad*などの遺伝子は背腹に関して発現パターンに差が見られることが分かっており、シンテニーと発現パターンを基に*Da*遺伝子の候補として考えられた。

### 整列化コスミドライブラリーの作成

*Da*遺伝子近傍のマーカーを足掛かりとして染色体歩行を開始し、物理的地図を作成するために、HNIシステムを利用してメダカコスミドライブラリーを作成した。独立した61クローンを調べたところ、インサートDNAのないクローンは皆無で、平均インサート長は40.2 kbであった。約12万クローン (メダカハプロイド6ゲノム分に相当) を384穴マイクロタイタープレート上に整列化した。また、迅速なスクリーニングを可能にするために、ライブラリーのDNAプールを作成し、PCR法を利用して2日で目的のクローンが得られる系を確立した。18個のSTSマーカーを用いてテストスクリーニングを行ったところ、全てについて対応クローンが得られた。また、*Da*遺伝子近傍の2個のマーカー(*stsM02-5*と*stsB07-3*)を含むコスミドクローンを得ることに成功した。

### *Da*遺伝子近傍の物理的地図の作成



遺伝的に近接して連鎖している2個のマーカー、stsM02-5とstsB07-3をそれぞれ含むコスミドクローンをプローブとして用いて、メダカ間期核に対してFISHを行い、これらのマーカーが物理的にも近接して存在していることを明らかにした。

そこで、これら2個のマーカーから染色体歩行を開始し、BACクローンとコスミドクローンを用いて、*Da*遺伝子を完全にカバーするコンティグマップを完成させた。次に、BAC、またはコスミドクローンの末端配列から多型性STSマーカーを設定し、組換えバッククロス個体を利用して*Da*変異を含む最小領域の決定を行った。その結果、70 ~ 250 kbの範囲内に*Da*変異が含まれていることが明らかになった。従って*Da*遺伝子は、1 ~ 2個のBACクローンでカバーされることが期待された。



## 緒言

受精卵が分裂増殖し、分化し、複雑な構造を形成する形態形成のメカニズムを解明することは、生物学者にとって魅力的なテーマの一つである。古くはシュベーマンがイモリを用いて移植実験を行い、原口背唇部が二次軸を誘導することを発見したことから始まる。ごく最近になり、移植実験のような手法を用いた実験発生学と近年発展してきた分子生物学とが融合し、発生過程の様々な現象が分子レベルで語られるようになってきた。生物の体の構造は、頭尾軸、背腹軸、左右軸の3つの軸より成り立っており、各々の軸上の適切な位置に適切な器官が形成される。従って、各々の軸における位置情報が如何に決定されていくのかを知ることが重要である。これらは、遺伝的プログラム、及び細胞間相互作用に従って決定されるわけであるが、近年、軸形成に関与する様々な遺伝子とその役割が明らかになりつつある。脊椎動物の軸形成に関してはアフルカツメガエルを用いた研究が盛んに行われており、シュベーマンオーガナイザー因子の研究などにより、背腹軸のパターニングに必要な分子 [Noggin (Smith and Harland 1992), Chordin (Sasai *et al.* 1994), Follistatin (Hemmati-Brivanlou *et al.* 1994), BMP4 (Dale *et al.* 1992; Jones *et al.* 1992) など] やそれらの相互作用について多く報告されている。しかし、これらはかなり初期の段階（囊胚期）の話であり、さらに後のステージで、初期に決定された位置情報がどのように受け継がれて最終的な形態を形成するのかについては不明な点が多い。ニワトリやマウスを用いた研究では、神経管や体節において背腹で発現パターンが異なるいくつかの遺伝子が知られているが、これらの遺伝子の相互関係やカスケードなどについても完全に解明されたわけではない。

近年、小型魚類であるゼブラフィッシュを用いた発生学的、遺伝学的研究が欧米を中心に勢力的に行われ、脊椎動物のモデル生物としての地位が確立された。ゼブラフィッシュは、卵生の小型淡水魚であり、発生が体外で進み胚が透明なので初期発生における形態形成過程を容易に観察することができる。細胞系譜を追跡することや、組織レベル、細胞レベルでの移植実験も可能であるため、発生学的解析に適している。また、多くの卵を回収してたくさんの減数分裂を解析できる、半数体や同型接合体が作製できるなど、遺伝学的解析も可能である。さらに脊椎動物で初めての大規模な突然変異体のスクリーニングも行われ、多くの興味深い表現型を

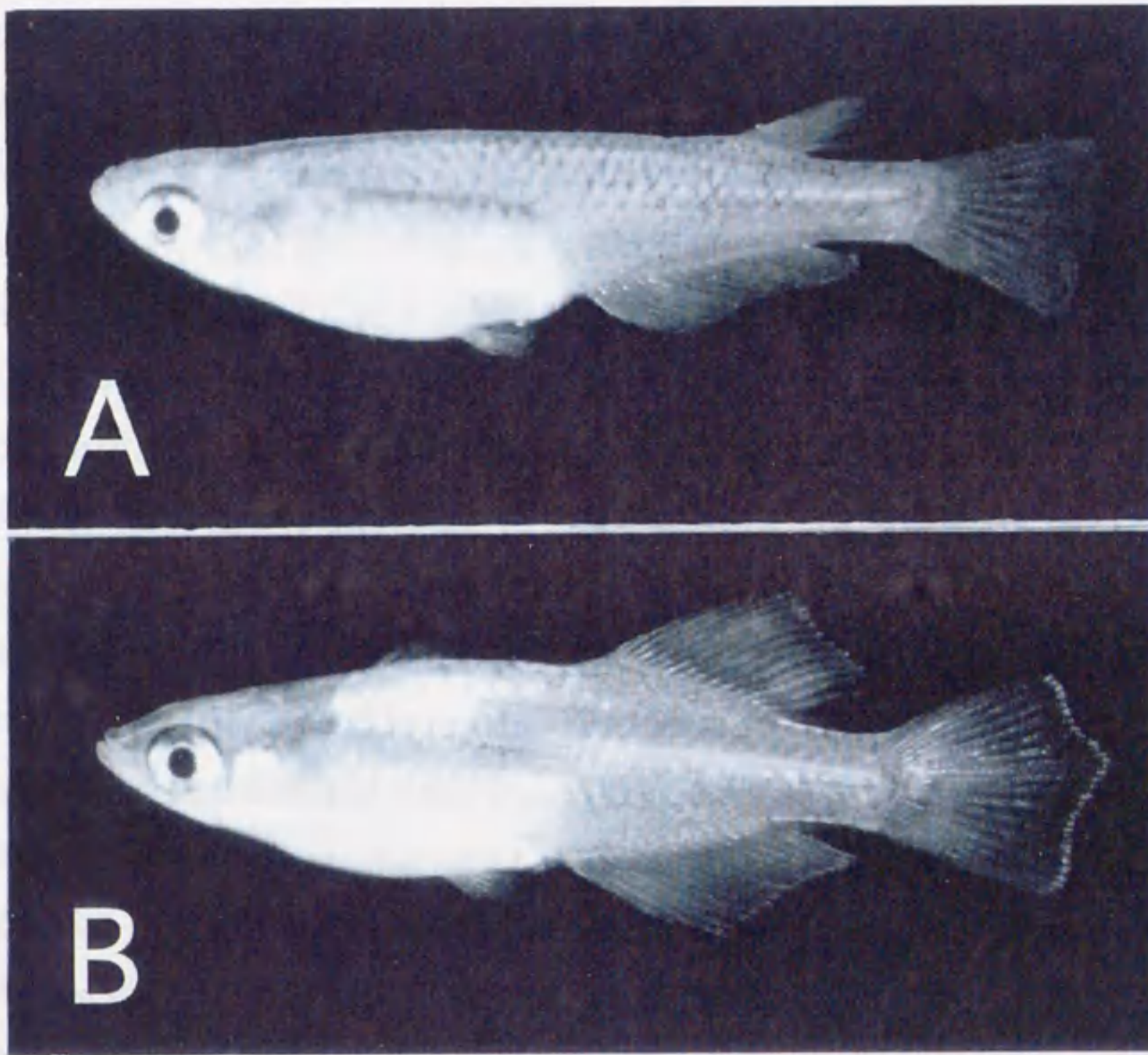


示す変異体が単離された (Haffter *et al.* 1996; Driever *et al.* 1996)。飼育は容易であり、体長が3~4 cm程度と小さいため大量の個体を扱いやすいなど、実験動物に適した性質を数多く備えている。最近では、ヒト疾患の新しいモデルとしても注目されてきている (Zon 1999)。

ゼブラフィッシュと同じ小型淡水魚であるメダカ (*Oryzias latipes*) は日本国内に広範に棲息し、モデル生物としてゼブラフィッシュと同様の発生学的、遺伝学的利点を備えている。受精から孵化までの時間は、ゼブラフィッシュが48時間であるのに対してメダカは約1週間であり、発生速度が遅い分メダカでは様々な胚操作を行う際の時間的余裕がある。加えて、ハプロイドゲノムサイズが800 Mbとゼブラフィッシュの約半分であり、近交系が確立されている (Hyodo-Taguchi and Sakaizumi 1993)、遺伝的に離れた系統がある等の利点もある。さらに変異体については、自然発生突然変異体が約80種程単離され、系統維持されている (Tomita 1975, 1992; Ozato and Wakamatsu 1994)。最近ではENUや $\gamma$ 線を用いた変異体作成も行われ、ゼブラフィッシュの変異体には見られない表現型を示す個体も単離されつつある (Ishikawa *in press*)。これらのことから、メダカもゼブラフィッシュと同様に、脊椎動物のモデル系として期待できる。

我々の研究室で継代維持を行なっているメダカ突然変異体のうち *Da* (*double anal fin*) 突然変異体は、胴尾部において背側が腹側化した表現型を示す。 *Da*-/*Da*- (*Da*変異体) の成体では、背鰭が尻鰭様の構造をしている、尾鰭が菱形をしている、野生型では腹部にしか存在しないイリドフォア (虹色素細胞) が背側にもみられるなど、背側が腹側の鏡像対称となっている (Tomita 1969, 1975; 図1-1B)。色素細胞は神経冠細胞から派生し、鰭原基の分化も神経冠由来の細胞の影響を受けることから、 *Da* 遺伝子は神経冠細胞の移動や分化に関係する遺伝子である可能性も考えられる。しかし、尾部の筋肉や一部の神経繊維、血管の分岐パターンなど、神経冠細胞に由来しない領域にも表現型が現われ、どの表現型が *Da* 変異の直接の影響によるものかが不明であるため、原因遺伝子がどのようなものかを推測することは困難である (Ishikawa 1990)。発生学的な研究の結果、 *Da* 変異体の表現型は孵化以前から現れることが示されている (Tamiya *et al.* 1997)。最も早く現われる表現型は、stage 29 (34体節期; 受精後約3日) における背側メラノフォアの配列である。野生型では、腹側のメラノフォアは二列に並んでいるのに対して、背側は一列に配列している。一方 *Da* 変異体では、腹側だけでなく背側も二列に並んでいる (図3-4参照)。





### 図1-1 メダカ成体の表現型

(A) 野生型 (+/+) 雌 (HNI系統)。背鰭と尾鰭が正常。多くの虹色素胞 (イリドフォア) が腹部にのみ確認される。(B) *Da*変異体 (*Da*-/*Da*-) 雄。背鰭は尻鰭様の形態を示し、尾鰭は菱形になっている。虹色素胞は腹部だけでなく胴部背側にも見られる。胴尾部において背側が腹側の鏡像対称の表現型を示している。



また、stage31（鰓血管完成期；受精後約4日）では、背側膜鱗の派生位置に*Da*変異体の表現型が確認できる。これらのことから、*Da*変異体では個体発生の途中で背腹構造の形成に関与する何らかの遺伝子に変異しているものと考えられる。しかし、体軸の形成という点から見ると、*Da*変異体の表現型が現われる時期はかなり遅い。通常、体軸はかなり初期のステージで決定され则认为られているが、*Da*変異体のように遅いステージで影響がでるにもかかわらず、背腹構造に関してこのような著しい表現型を生ずることはたいへん興味深いものである。顕著な表現型を示しているにもかかわらず、*Da*変異体の行動、生殖能は正常である。これらの表現型は不完全優性のメンデル遺伝様式に従うことから (Tomita 1975) 単一遺伝子上に起こった変異に支配されているであろうと推測されているが、これまで、他の突然変異体やマーカー、単離された遺伝子との連鎖関係については知られていない。

現在までに、他の脊椎動物において*Da*変異体のように背腹構造に関して鏡像対称となる表現型を示す変異体の報告はない。近年、メダカと同じ小型魚類であるゼブラフィッシュを用いて、脊椎動物で初めて大規模な突然変異体のスクリーニングが行われた (Haffter *et al.* 1996; Driever *et al.* 1996)。その結果、様々な形態形成過程に異常を持つ変異体が単離され、背腹軸形成に関しては、8個の遺伝子の変異体が単離された (Hammerschmidt *et al.* 1996; Mullins *et al.* 1996)。しかし、いずれの変異体も、表現型が現れる時期が*Da*変異体より早く、変異が見られる組織やその形状も*Da*変異体とは異なっていた。さらに重要なことは、これらゼブラフィッシュの変異体は全て、背側、もしくは腹側の組織が、拡大か縮小するという表現型を示しており、*Da*変異体のように背腹構造に関して鏡像対称を示す変異体は単離されなかった。*Da*遺伝子が、これらゼブラフィッシュの変異体の原因遺伝子オーソログの異なる変異（別アレル）である可能性もあるが、以上のことから、異なる遺伝子の変異である可能性が高いと考えられる。背腹軸形成に関しては、主にアフリカツメガエル胚を用いて研究されており、背腹軸のパターニングに関わる様々な遺伝子が単離されてきているが、それらの中から*Da*変異体のユニークな表現型をもとに原因遺伝子の候補を推測することは困難である。従って、*Da*遺伝子が新規遺伝子である可能性も高く、*Da*遺伝子を同定しその機能を解析することは、脊椎動物の胚発生に於ける背腹構造のパターン形成に関して、重要な知見をもたらすものと考えられる。

近年、ヒトやマウスをはじめとする様々な生物種で、ポジショナルクローニ



ングの手法を利用し、疾患もしくは変異体の原因遺伝子が単離されるようになってきた。ポジショナルクローニングは、生物学的、生化学的な情報がなく、候補遺伝子の類推が不可能な時にでも、染色体上の位置情報のみを利用して確実に目的の遺伝子へアプローチすることができる有力な方法である(図1-2)。実際には、遺伝地図や物理地図を作成して染色体上の位置を同定して狭めていき、その領域内に存在する候補遺伝子の探索を行う。これは、多大な労力を要する手法であるが、ゲノム上に広範囲に存在し、多型の頻度が高いマイクロサテライト等の多型性マーカーが充実し、またこれらを利用して高密度遺伝的連鎖地図が作成可能になったこと、巨大DNA分子を分離できるパルスフィールドゲル電気泳動(Schwartz and Cantor 1984)や、YAC(yeast artificial chromosome)(Burke *et al.* 1987)、BAC(bacterial artificial chromosome)(Shizuya *et al.* 1992)、PAC(P1-derived artificial chromosome)(Ioannou *et al.* 1994)、P1(Sternberg 1990; Pierce *et al.* 1992)、コスミド(Collins and Hohn 1978)など、大きなDNAをクローニングできるベクター系が次々と開発、改良されてきたこと、を含め、様々なリソースが充実したことにより現実的になった。手法自体は生物種に依存しないため、遺伝的な解析が行える生物であれば実行可能である。ゼブラフィッシュにおいても、詳細な遺伝的連鎖地図(Postlethwait *et al.* 1994; Knapik *et al.* 1998; Gates *et al.* 1999; Shimoda *et al.* 1999)や、巨大DNA分子をインサートに持つゲノムライブラリー(Zhong *et al.* 1998; Amemiya *et al.* 1999; Amemiya and Zon 1999)が作成されたことにより、ポジショナルクローニングの成功例が報告されている。

メダカでは本研究開始当初、高密度遺伝的連鎖地図やゲノムライブラリーなど、ポジショナルクローニングを行う上で必須となるリソースが整備されていなかった。Wada *et al.* (1995)により、メダカ遺伝的連鎖地図が作成されたが、マーカーの数や密度、利用しやすさの点から考えても十分なものとは言えなかった。そこで、本研究では、*Da*変異体の原因遺伝子をポジショナルクローニングの手法を用いて単離することを目的として、*Da*遺伝子を遺伝学的にマッピングし、BACライブラリーとコスミドライブラリーを利用して*Da*遺伝子領域の物理的地図の作成を行った。また、その過程で、新規メダカ遺伝的連鎖地図やコスミドライブラリー等の、ゲノム解析を行う上で重要なリソースを作成した。



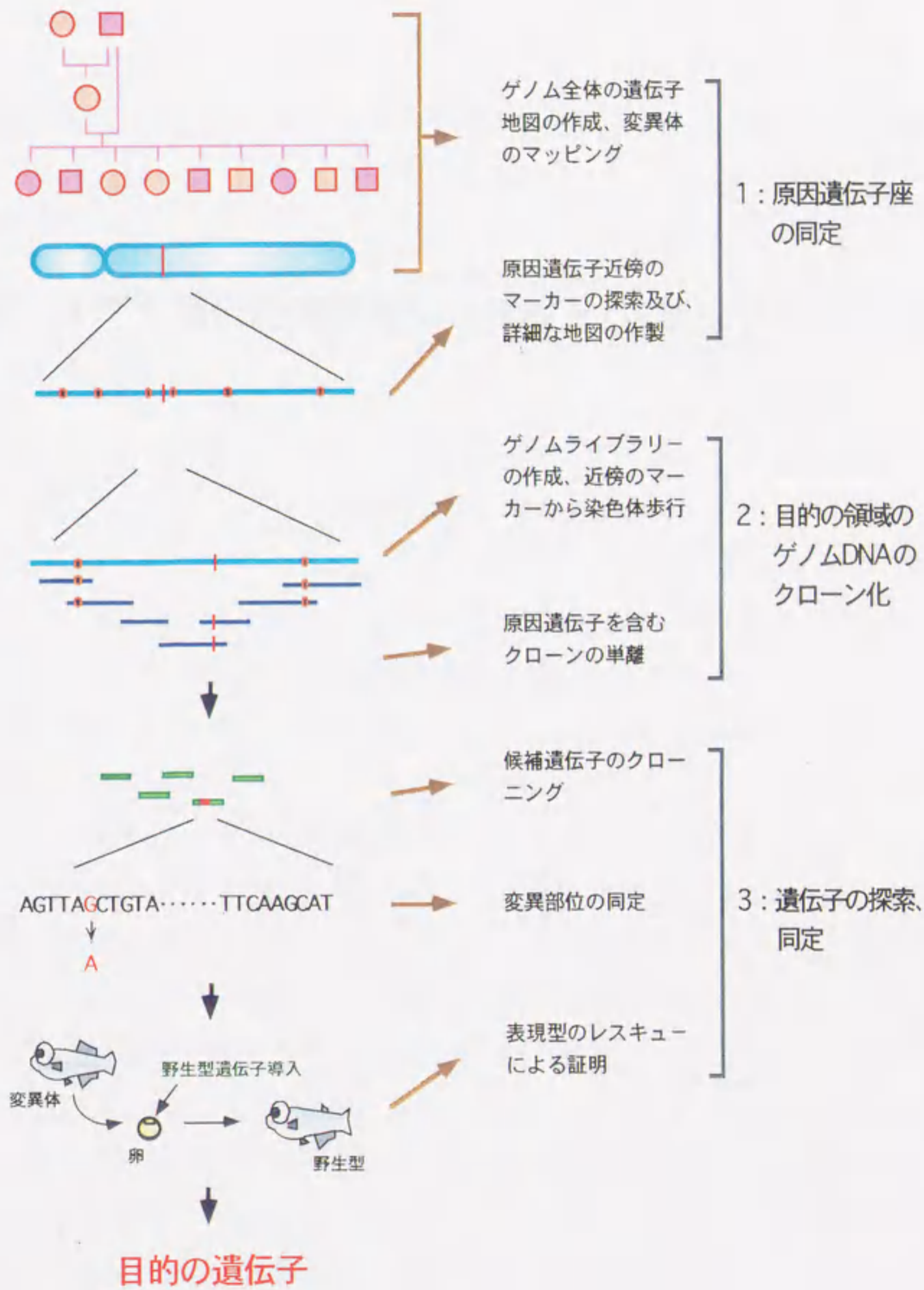


図1-2 ポジショナルクローニングのアウトライン

ポジショナルクローニングは、染色体上の位置を手掛かりとして遺伝学的に変異体の原因遺伝子を単離する手法である。まず、遺伝子地図を作成し、マッピングを行い近傍のマーカークを探すことによって原因遺伝子座を同定する。次に、ゲノムライブラリーを利用して染色体歩行を行い原因遺伝子の領域をカバーすることによって、目的の領域のゲノムDNAをクローン化する。最後に、候補遺伝子とその変異部位を探索し、野生型遺伝子の導入によるレスキュー実験を行うことによって、遺伝子の探索、同定を行う。



### 第一部：メダカ遺伝的連鎖地図の作成と*Da*遺伝子のマッピング

メダカは、その豊富な変異と、ゲノム解読の進展に伴って、モデル生物として注目されている。本研究では、メダカの遺伝的連鎖地図を作成し、*Da*遺伝子の位置を特定することを目的とした。まず、メダカの近交系を構築し、F2世代の個体をスクリーニングして、連鎖群を決定した。その後、連鎖群ごとにマーカー遺伝子を選択し、連鎖地図を作成した。この結果、メダカの連鎖地図が作成され、*Da*遺伝子の位置が特定された。

メダカの連鎖地図を作成する際、連鎖群の決定は重要なステップである。本研究では、連鎖群の決定に、連鎖分析を用いた。連鎖分析は、連鎖群の決定に有効な方法であり、本研究でも適用された。また、連鎖群の決定には、連鎖群ごとにマーカー遺伝子を選択することが必要である。本研究では、連鎖群ごとにマーカー遺伝子を選択し、連鎖地図を作成した。

メダカの連鎖地図を作成する際、連鎖群の決定は重要なステップである。本研究では、連鎖群の決定に、連鎖分析を用いた。連鎖分析は、連鎖群の決定に有効な方法であり、本研究でも適用された。また、連鎖群の決定には、連鎖群ごとにマーカー遺伝子を選択することが必要である。本研究では、連鎖群ごとにマーカー遺伝子を選択し、連鎖地図を作成した。



## 緒言

近年急速に普及してきた、疾患や変異体の原因遺伝子単離の有力な手段であるポジショナルクローニング法は、その名の通り染色体上の位置を手掛かりとして未知の遺伝子をクローニングする手法である。本法は、表現型と密接に連鎖するマーカーを探索して連鎖解析を行い、原因遺伝子の染色体上での存在部位を決定する（マップする）ことから始まる。その後、徐々に候補領域を狭めながら、最終的に目的の遺伝子をクローニングするに至る（図1-2）。これまでに、ポジショナルクローニング法を用いて単離された遺伝子の例は数多くある。最初の成功例はヒトのDuchenne型筋ジストロフィー（Koenig *et al.* 1987）であり、その後、嚢胞性線維症（Rommens *et al.* 1989; Riordan *et al.* 1989; Kerem *et al.* 1989）、脆弱X症候群（Verkerk *et al.* 1991）など、様々なヒト疾患の原因遺伝子が単離された。本法は遺伝学的な解析が可能であれば生物種に依存しないため、マウス（Nehls *et al.* 1994）やメダカと同じ魚類であるゼブラフィッシュ（Zhang *et al.* 1998）においても適用され、成功を収めている。

ポジショナルクローニングを開始するためには、原因遺伝子の染色体上の位置を知る必要がある。大きな欠失や転座などの染色体異常が観察されない場合には、連鎖解析を行って遺伝的に連鎖地図上にマッピングし、目的の遺伝子の近傍に位置するマーカーを得なくてはならない。従って、様々な変異体のポジショナルクローニングを行う上で、その生物種の遺伝的連鎖地図が整備されていることは重要である。遺伝的連鎖地図は、父方と母方から受け継がれたそれぞれの相同染色体を区別するような多型と、減数分裂時の相同染色体間の組換えを利用して作成される。

遺伝的連鎖地図の一番最初の報告は、ショウジョウバエで作成されたものである（Sturtevant 1913）。その後すぐにマウスなどの脊椎動物にも応用された（Haldane *et al.* 1915）。これらの初期の連鎖地図は、多型性マーカーとして表現型多型を利用したものであった。しかし、表現型多型には様々な問題点がある。遺伝的連鎖地図は、全ての染色体上の全ての領域にマーカーが均一に分布していることが理想的である。大腸菌や酵母などの場合には、古典的な変異導入法によりこのような表現型マーカーを得ることも可能であるが、進化的に高等な生物になるにつれ、表現型マーカーを作成することが困難になり、ヒトでは倫理的に不可能である。



また、同じ個体に多くのマーカーを導入することも難しく、いくつものマーカーからなる地図を作成するには、多くの掛け合わせ実験を行わなくてはならない。こうして作成された地図同士を結び付ける（アンカーする）こともかなり困難である。さらに、得られた表現型マーカーが、致死であったり、他のマーカーとの間にエピスタティックな関係がある場合などに応用不可能なことがある。

1980年頃より、連鎖地図作成にDNA多型が利用されるようになってきた。DNA多型はゲノム全体に広範囲に、そして十分な数存在している。特に、マイクロサテライトマーカーなどでは、多型性がかなり高いため、ヒトなどのそれまで高密度遺伝子地図を作ることが不可能であると考えられていた生物種でも、容易に作成することが可能となった（Weissenbach 1993; Dib *et al.* 1996）。このように、DNAマーカーは表現型マーカーと比べて有利な点が多い。利用されるDNA多型には、制限断片長多型（restriction fragment length polymorphism: RFLP）（Botstein *et al.* 1980）、VNTR（variable number of tandem repeat）（Nakamura *et al.* 1987）やマイクロサテライト（Weber and May 1989）などの繰り返し配列、RAPD（random amplified polymorphic DNA）（Welsh and McClelland 1990; Williams *et al.* 1990）、SNPs（single nucleotide polymorphisms）（Collins *et al.* 1997; Kruglyak 1997）などがあり、各々に長所、短所が存在する。例えばRAPDマーカーの場合、再現性が低い、ほとんどのマーカーがドミナントでありヘテロ接合体を区別できないなどの欠点もあるが（Black 1993; Devos and Gale 1992; Riedy *et al.* 1991）、前もって塩基配列情報が必要ではなく、PCR法を利用するため迅速に連鎖地図を作成することが可能であるという利点がある。

連鎖地図に使用されるマーカーは、表現型マーカーかDNAマーカーであるかという以外に、そのマーカー自身が遺伝子であるのか否かによって分類する考え方もある。マイクロサテライトマーカーなどのanonymousなマーカー（type IIマーカー）は、多型性が大変高く、高密度遺伝子地図を作成しやすい等の利点があるが、通常種特異的なマーカーである。一方、発現遺伝子マーカー（type Iマーカー）は、多型性は低い異なる生物種間で同じ遺伝子マーカーを共有できる。従って、type Iマーカーを利用して生物種間で相同な染色体領域を捜し出すことが可能である。これを利用して、ヒトのように"map-rich"な生物種の相同な領域の情報を他生物種に応用することもできる。近年、ヒトと魚類のように進化的にかなり離れた生物種間においても、染色体領域が保存されていることが分かってきている（Koop and



Nadeau 1996; Postlethwait *et al.* 1998)。よって、メダカなどの遺伝子地図が整備されていない生物種においても、type Iマーカーをマップすることによってヒトの遺伝子地図情報を利用し、位置的候補遺伝子アプローチ法を用いて変異体の原因遺伝子を探索することも可能となる。

連鎖地図を作成するには多型性マーカーを効率よく集めることが重要になる。これは、多型性が高く、ゲノム上に多く存在するようなマーカーを使用する、もしくは多型性が高いと考えられる遺伝的に離れた系統を使用して掛け合わせを行うことで達成される。日本に棲息しているニホンメダカは、遺伝的に大きく異なる二つの集団に分かれる (Sakaizumi *et al.* 1983)。一つは北日本集団で、青森県の東部から丹後半島の東側までの日本海側に分布している遺伝的に均一な集団である。もう一つは、それ以外の地域に分布する南日本集団で、これらは幾つかの地域集団が存在する。*Da*変異体は南日本集団に属している。北日本集団と南日本集団の間の遺伝的距離は大きく、タンパク質多型解析から、両集団は約150万年前に分岐したと考えられている (Sakaizumi *et al.* 1983)。従って、これらの遺伝的に離れた系統間の掛け合わせを利用することにより、効率的に多型を得てマップすることが可能だと考えられる。

Wada *et al.* (1995)は、北方型HNI系統 (図1-1A) と南方型Hd-rR、AA2 (表1-1) 間の掛け合わせとRAPDマーカーを利用して、メダカ遺伝的連鎖地図を作成した。これは雄の組換えに基づくものであった。しかしながら、既存の地図はメダカゲノムを完全に網羅するものではなかった；連鎖群の数はメダカのハプロイド染色体数 (24; Iriki 1932) より3本多い27本であり、67個のマーカーがunlinkであった。従って、既存の地図上のマーカーのみを使用して連鎖解析を行った場合に、目的の変異体がマッピングされない可能性もある。また、既存の地図には遺伝子マーカーはマップされていなかった。

本研究では、遺伝子マーカーを含む数種類のマーカーを使用して、雌の組換えに基づく新規メダカ遺伝的連鎖地図を作成し、*Da*遺伝子のマッピングを行った。その結果、*Da*遺伝子はLG VIIIにマップされ、その近傍に存在し、染色体歩行の開始点となりうるマーカーを得ることができた。また、遺伝子マーカーをマッピングすることにより、メダカと、ヒトやゼブラフィッシュ間において進化的に保存されているいくつかの染色体領域を同定した。さらに、両方の連鎖地図が有用に活用できるように、本研究で作成した連鎖群と既知の地図上の連鎖群との対応関係を明らか



とした。以下述

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、日本の企業文化と欧米の企業文化を比較し、その違いを明らかにすることである。また、日本の企業文化が海外市場での競争力に与える影響についても検討する。具体的には、以下の点について調査を行う。① 組織構造と意思決定の過程、② 従業員のモチベーションと忠誠心、③ 顧客サービスと品質管理、④ 人間関係とコミュニケーション。調査データは、インタビュー、アンケート、および文献調査に基づいて収集される。分析結果は、日本の企業文化の強みや弱みを明らかにし、今後の経営戦略に役立つ知見を提供することを目的とする。

本研究の意義は、グローバル市場における日本の競争力向上に貢献することにある。また、異なる文化背景を持つ人々の相互理解を促進し、国際的な協力を促進する役割も果たすことが期待される。

### 3. 研究の範囲

本研究の範囲は、製造業とサービス業の両分野に限定される。調査対象は、東証1部上場企業と、主要な海外市場に進出している企業に限定される。調査期間は、2023年1月1日から2024年3月31日までとする。研究の限界として、調査対象の企業が必ずしも典型的な企業文化を持つとは限らない点、および調査期間が短いことによるデータの信頼性の限界を指摘する。



## 材料及び方法

### 1. 系統及び掛け合わせ

*Da*変異体は南日本集団から単離された自然発生突然変異体である (Tomita 1975; 図1-1B)。その後、他の集団からの遺伝子の導入なくクローズドコロニーとして維持されており (表1-1)、遺伝的にほぼ均一になっていることが期待される。遺伝的連鎖地図を作成し、*Da*変異体の原因遺伝子をマップする際に使用する多型性マーカーを効率よく集めるために、北方系統系野生型系統のHNI-1 (Hyodo-Taguchi and Sakaizumi 1993; 図1-1A) との掛け合わせを行った (図1-3)。HNI-1と*Da*変異体との掛け合わせから得られたF1個体を*Da*変異体に戻し交配することにより、バッククロス個体 (BC1) を625個体得た。その内の545個体はF1雌、残りの80個体はF1雄を戻し交配することにより得られた。これらのバッククロス個体は表現型が完全に識別可能になるまで飼育し (孵化直後から孵化後3週間程度)、背側メラノフォアの配列と膜鱗の形態 (Tamiya *et al.* 1997) を観察することにより*Da*遺伝子の遺伝子型の判別を行った。雌の組換えに基づく42個体 (表現型が野生型の個体21個体、表現型が*Da*の個体21個体) をランダムに選び、メダカゲノム全体の遺伝的連鎖地図の作成に使用した。残りの個体は、*Da*遺伝子を詳細にマッピングする際に用いた。

NIL (Near Isogenic Line) は新潟大の酒泉教授により譲与して頂いた。9回のバッククロスを行うことにより (BC9)、HNI系統の遺伝的バックグラウンドの中に*Da*変異遺伝子を導入したもの (表現型*Da*: BC9F1) である。NILは、*Da*遺伝子と連鎖するRAPDマーカーのスクリーニングを行う際に使用した。

### 2. RAPDマーカー

RAPD法についてはWilliams *et al.* (1990)の方法に基づくが、多少の変更を加えた。RAPD primerには、任意の配列の、12ヌクレオチドprimer100種類の他に、10~21ヌクレオチドのprimer31種類の計131種類を用いた。PCR反応液は、10 mM Tris-HCl (pH8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, それぞれ200 μMのdNTP, 250 nM



表1-1 本研究で使したメダカ純系系統と変異体

Name	Population	How to maintain	Mutant genes
inbred strains			
HNI	northern	sister × brother mating	
AA2	southern	sister × brother mating	<i>b, lf, gu</i>
Hd-rR	southern	sister × brother mating	<i>b, r</i>
mutant			
<i>Da</i>	southern	closed colony	<i>Da</i>

*b* , colorless melanophores; *r* , colorless xanthophores (X-linked); *lf* , leucophore-free; *gu* , guanineless; *Da* , Double anal fin



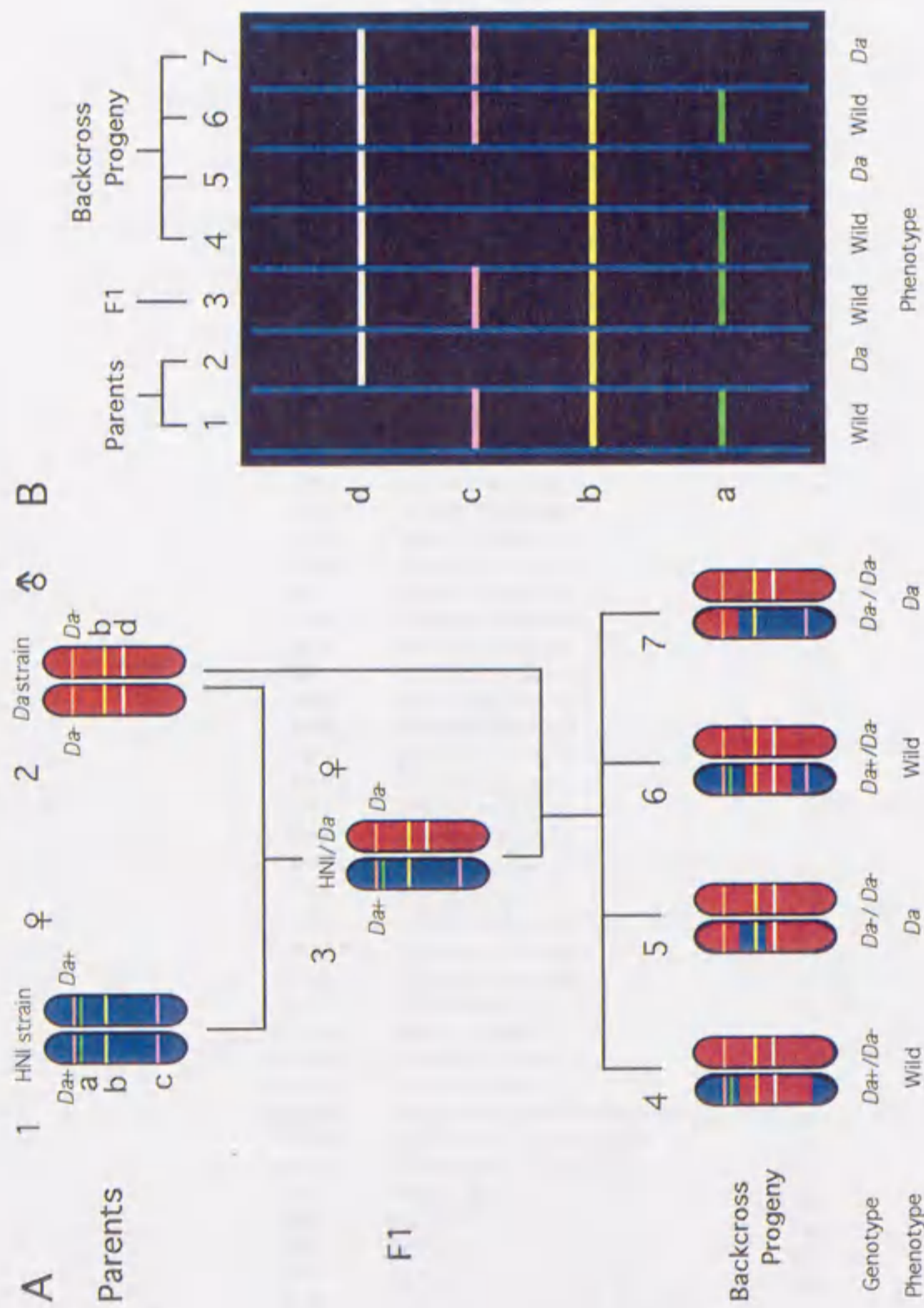


図1-3 メダカ掛け合わせ及びマッピングの原理

A: メダカ掛け合わせの図。Da遺伝子が存在する染色体のみを示す。染色体の青い領域がHNIに由来するもので、赤い領域はDaからのものである。a, b, c, dは、RAPD法もしくは通常のPCR法で増幅されるマーカーの座位を示す。B: Aで示した個体についてのPCR産物 (RAPD産物) の電気泳動像。HNIとDa変異体とともに持つマーカーb、及びDa変異体のみを持つマーカーdは全てのバッククロス個体に現れる。aとcは共にHNI特異的なマーカーであり、確率的に50%のバッククロス個体を受け継がれるが、Da+と非常に近い位置にあるaのマーカーは、その間で組み換えが起こる確率が少ないので、Da+を受け継いだ表現型が野生型のバッククロス個体に高い頻度で現れる。よって、野生型の表現型と挙動を共にするバンドが、Da近傍のマーカーということになる。図A、図B中のa, b, c, dは共に対応している。Da+: 野生型のDa対立遺伝子、Da-: 変異型のDa対立遺伝子。



表1-2 RAPD primerの配列とサイズ、及びそのprimerを使用して得られるHNI系統特異的RAPDマーカーの数

Primer name	Sequence	Size (mer)	No. of HNI strain specific markers
M00	ATCAGCGCACCA	12	2
M02*	GCCAGCTGTACG	12	2
M04	GCCCCGTTAGCA	12	1
M05	CCGCAGTTAGAT	12	1
M06*	ACTGGCCGAGGG	12	8
M09	AGAATTGGACGA	12	1
M10*	GCCTGCCTCACG	12	2
M13	CTCAGCGATACG	12	1
M16	ATTTGGATAGGG	12	1
M19	AAGGCGCGAACG	12	2
M21	GTGACCGATCCA	12	1
M24*	GACGGTTCAAGC	12	3
M25	GGTCAGGCACCA	12	3
M30	CCTTTCCGACGT	12	2
M34	CCTGCGGGAGGA	12	1
M38	ATCTTCTCATCT	12	1
M40	GCGGAGGAACCA	12	2
M43	ACTCTTCTACAA	12	1
M50*	ATTGGTGCAGAA	12	6
M51	AAGTCGTTTGGG	12	2
M53	GACGCCATTAT	12	1
M58*	GTCATGCCTGGA	12	4
M61	TCGGTGGGAATA	12	1
M63	CAGGTGTGGGTT	12	1
M68	ACTTTCGATCCA	12	2
M69	AAGCCTATACCA	12	2
M73	AGCACTGAATCT	12	3
M75	GGCGGTTATGAA	12	2
M76	GTCATTAAGCT	12	2
M81*	GGCGAGGGAGGA	12	2
M82	GAGAGACGATTA	12	1
M83	ACTGGCCGGCAT	12	2
M84	GAGACTGCTGAT	12	1
M86	TCCTGGGGCGTT	12	1
M87	GCCGCCAGAGGA	12	2
M90*	ACTGAGCAACAA	12	5
M91	GGCAAGGGATAT	12	1
M93	AGACCTGCTTCT	12	2
M97	GTGTGGAAGCCA	12	1
M98*	GACGGTTCTACA	12	4
M99	GCGGTCAGCACA	12	1
NTU9	TGCACAACCTG	10	3
NTU10	ACGGTACACT	10	1
NTU11*	CGGCCCTGT	10	4
NTU12*	GTATTGCCCT	10	6
NTU29*	CAGTAGAAGCTGCATAGGGTC	21	3
NTU30	GTCCATTAGTCGGTGCT	18	2
NTU31	TCGATGAAGAACGCAGC	17	5
B01	TGACGGGATGAGACCA	16	2
B02	TGGTCTCATCCCGTCA	16	2
B03	ACCCGTTTCAGACGAA	16	1
B04*	GTTCTGCTGAAACGGG	16	4
B05	GAGTGCAARTGYCACGGGATG	21	1
B06	TGGCAGCACCAGTGGAARGT	20	1
B07*	GTTTTCCAGTCACGAC	17	3
B08*	CAGGAAACAGCTATGAC	17	3
OPC15	GACGGATCAG	10	2
OPZ17	CCTTCCCACT	10	3
OPZ20	ACTTTGGCGG	10	3
59 (15*)			133

\*既存の地図との対応付けに用いたprimer



primer, 9 ng ゲノムDNA, 0.5 U Taq DNA ポリメラーゼ (TaKaRa) の組成とし、全量20  $\mu$ lに調製した。RAPDマーカーは、2種類のTaKaRaサーマルサイクラー (PJ2000とTP3000)を用いて、95°Cで5 min 変性した後、94°C 1 min, 36°C 1 min, 72°C 2 min を45サイクル行うことによって増幅した。増幅産物は、1.0%アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイドで染色しバンドの有無を解析した。

最初に、親であるHNI系統とDa変異体について様々なprimerでRAPD法を行い、HNIには存在するがDa変異体には出ないバンド、HNI特異的なバンドを増幅するprimerを選別した (表1-2 ; 図1-4A)。次に、そのような有用なprimerを用いて、バッククロス個体におけるHNI特異的なバンドの出現パターンを調べた (図1-4B)。

Da遺伝子に連鎖する多型性RAPDマーカーを探すため、200種類のRAPD primer (OPQ-Z; Operon Technologies) を用いて、NILとHNIのゲノムDNAをテンプレートとしてRAPD-PCRを行い、NILもしくはHNIに特異的なバンドを生じる primerを選別した (図1-5参照)。

### 3. STSマーカー

RAPDマーカーには幾つかの問題点がある (Black 1993)。その一つは再現性の問題である (Devos and Gale 1992; Riedy *et al.* 1991)。アニーリング温度を36°Cという微妙な条件でPCR法を行うため、使用するサーマルサイクラーやTaq DNA ポリメラーゼなどを含め、反応条件が少しでも異なった時に目的のバンドが増幅してこない場合がある。これはタイピングミスを導く恐れがある。従って、RAPDマーカーを通常のPCR法の条件でシングルバンドとして増幅するようなSTSs (sequence-tagged-sites; Olson *et al.* 1989) マーカーに変換することが望ましい。今回、16個のRAPDマーカーについて塩基配列を決定し、STS化を行った (表1-3)。RAPD-PCR産物をアガロースゲルで泳動し、目的のバンドを切りだし、回収後その断片をテンプレートとしてもう一度RAPD法を行った。2回目のRAPD産物を1%低融点アガロースゲル (SEA PLAQUE GTG AGAROSE; FMC) (in 1  $\times$  TAE) で泳動し、目的のバンドを切りだし、67°Cでゲルを溶かした。2.5倍量のTE bufferと1/10量の3 M NaOAcを加えさらに5 min インキュベートした。2回のフェノール処理後、エタノール沈澱を行って得られた断片を、TA Cloning Kit (In Vitrogen) を用いてクローニ



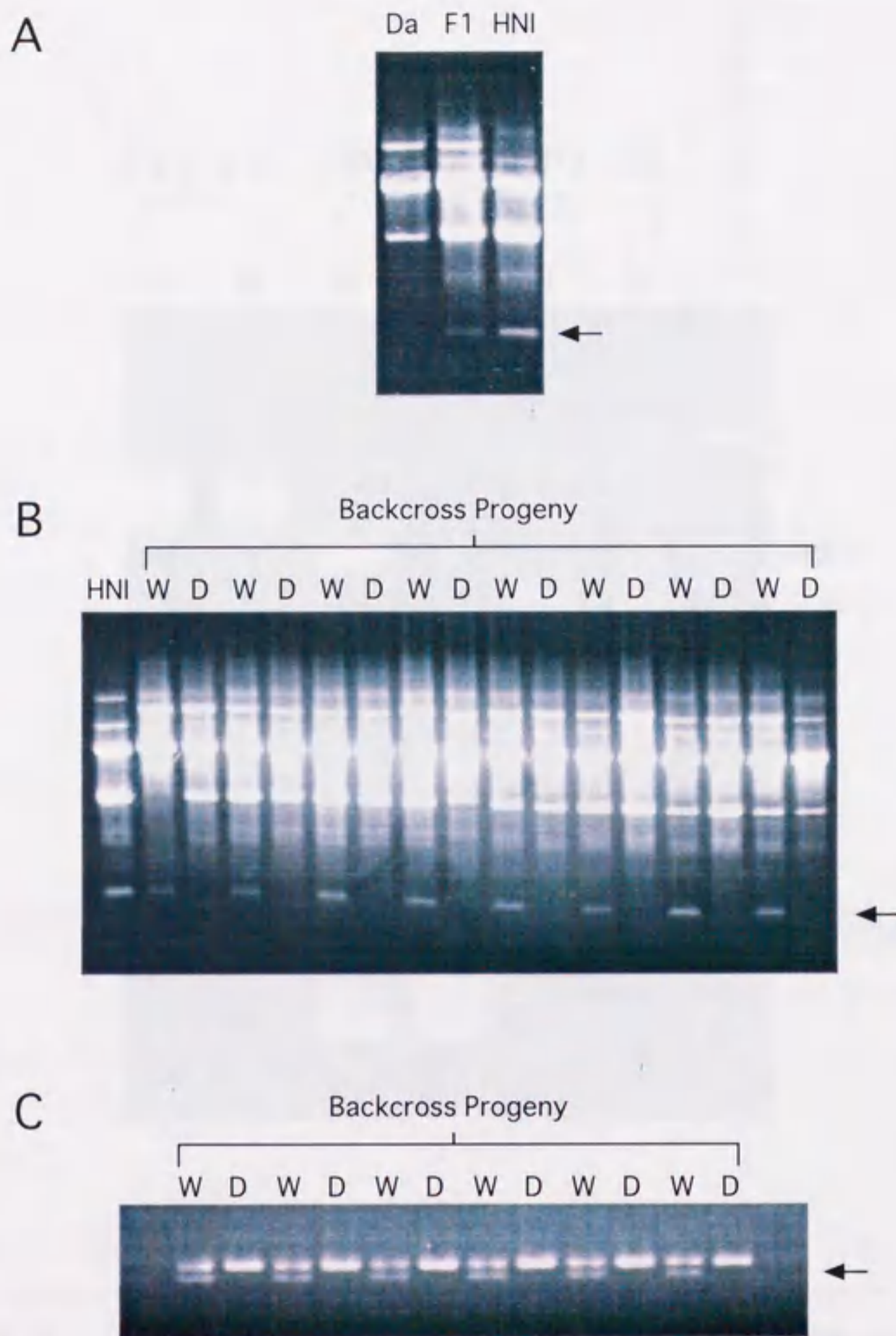


図1-4 *Da*遺伝子近傍のマーカーM02-5

A: RAPD primer M02を使用して、親系統であるHNIと*Da*と、それらを掛け合わせて得られたF1個体のゲノムDNAに対してRAPD法を行ったもの。矢印はM02-5マーカーであり、HNIとF1で増幅が確認される。B: 同じprimerを使用して、バッククロス個体に対してRAPD法を行った。W: 野生型の表現型を示す個体。D: *Da*の表現型を示す個体。M02-5マーカー（矢印）は、野生型の個体のみで増幅が確認された。これは、M02-5が*Da*遺伝子の近傍に存在することを示唆している。C: *stsM02-5*のHinf I切断泳動像。上記RAPDマーカーM02-5を多型性STSマーカー（*stsM02-5*）に変換した。Hinf I切断により、多型が確認された。図では、野生型の表現型を示すバッククロス個体のみ特異的な制限断片（矢印）が生じている。これは、STSマーカーの由来となるRAPDマーカーと同じパターンで現れる。



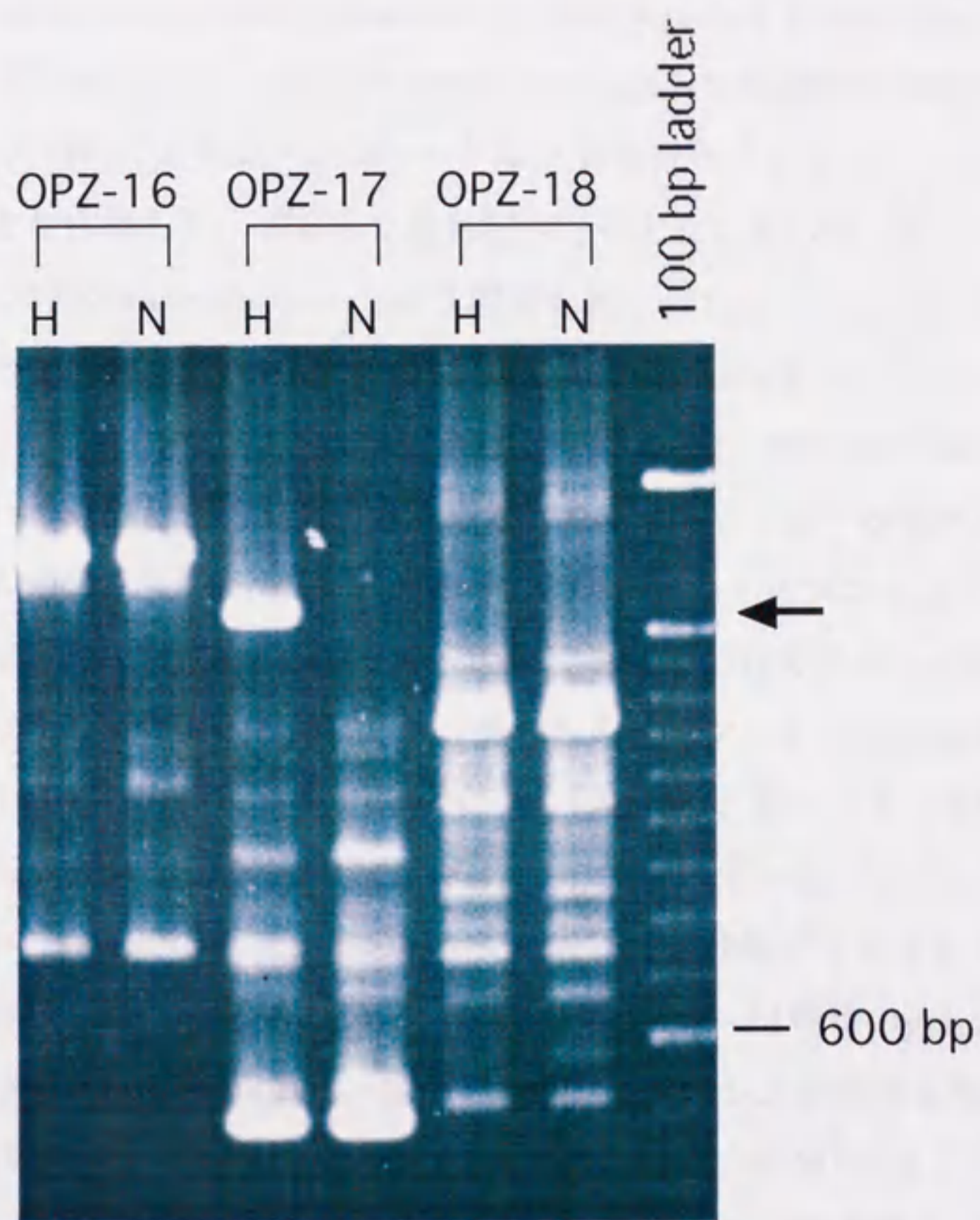


図1-5 HNIとNIL系統を利用した *Da*遺伝子近傍の RAPDマーカーの探索

*Da*遺伝子近傍に位置するマーカーを効率良く得るために、HNI系統と、バックグラウンドがHNI系統で*Da*遺伝子近傍の領域のみが*Da*変異体由来となっているNIL系統を利用して、どちらかの系統に特異的に増幅するバンドを生じるRAPD primerをスクリーニングした。この図では、primer OPZ-17を使用した時にHNI系統で特異的なバンドが確認される（矢印）。このバンド（OPZ17-1）は*Da*遺伝子が存在するLG VIII上にマップされた（図1-9）。



ングベクター-pCRIIにクローニングした。クローニングした断片はABI Prism Big Dye Primer Cycle Sequencing Ready Reaction FS Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンシング反応を行い、ABI 377 DNA sequencerで塩基配列を決定した。1個のRAPDマーカーについて3クローンのシーケンスを行うことによって、塩基配列に誤りがないことを確認した。決定した塩基配列をもとに、RAPD primer由来の配列の内側に新しく約20 baseのprimer pairを設定した。これらのprimerを用いて次の条件でPCRを行った。96 °C 5 min, 58 °C 30 sec, 72 °C 2 minを1サイクル行った後、96 °C 45 sec, 58 °C 30 sec, 72 °C 2 minを35サイクル行い、後に96 °C 45 sec, 58 °C 30 sec, 72 °C 5 minを1サイクル行った。増幅されたSTSマーカーが目的のRAPDマーカーに由来するか否かは、RAPD産物へのSTSマーカーをプローブとしたサザンハイブリダイゼーションや、STSマーカーの多型を同定した後にバッククロス個体でタイピングを行うことによって確認した。幾つかのSTSマーカーはHNI系統からのみ増幅されるか、増幅産物長に多型が見られたが(表1-3)、ほとんどのSTSマーカーはHNI系統とDa変異体の両方から増幅された。これらのマーカーについては、制限酵素処理を行うか、両系統のPCR産物の塩基配列を決定し比較することによって(表1-4)多型を検索した。stsB07-3とstsOPS11-1については2種類のprimer setを設定し、一方をタイピングに使用し、もう一方をシーケンスに使用した。7個のSTSマーカー[stsB07-3(図1-6A), stsM02-5(図1-6B), stsM90-3, stsOPR04-1, stsOPS11-1, stsOPX06-2, stsOPZ20-3]については両系統から完全な塩基配列を決定し、多型を確認した(図1-7)。3個のSTSマーカー(表1-3; asterisk)についてはDa遺伝子近傍の高密度マッピングにのみ使用した。

#### 4. 既知遺伝子

メダカで既に単離されている遺伝子に関しては、DNAデータベース上のメダカ塩基配列をもとにprimer pairを設定した。遺伝子を連鎖地図上にマップするためには多型を検索しなくてはならない。多型はタンパク質に翻訳されるコード領域よりもイントロンや5'もしくは3'UTRのような非コード領域に多く存在することが期待される。従って、ヒトやマウスなどの他生物種でエクソン-イントロン境界が知られているものに関しては、多型が効率よく得られるように、イントロンを内部に増



**A**

HNI	1'	GCTCACTGTTCTGGATCATCTAATGGAATTTAATTAATCTTGCATCAAATTTGTGTTCT
<i>Da</i>	1'	GCTCACTGTTCTGGATCATCTAATGGAATTTAATTAATCTTGCATCAAATTTGTGTTCT
	61'	TTTTATGCTAGAAGACATTTATTTGATGCGGGCCTCACTCATGAGGCAAAAAACAACAGCAG
	61''	TTTTATGCTAGAAGACATTTATTTGATGCGGGCCTCACTCATGAGGCAAAAAACAACAGCAG
	121'	AGCGAACCTCGGTTAGCCCTTCTGCCCCTACCAGGCTAGTTTGAGGTCTGACGTCATGC
	121''	AGCGAACCTCGGTTAGCCCTTCTGCCCCTACCAGGCTAGTTTGAGGTCTGACGTCATGC
	181'	ATCTTTACTACATTTCTCTGCGCACCGTGCCAGCATTCACACATTATCCAGAAGAAC
	181''	ATCTTTACTACATTTCTCTGCGCACCGTGCCAGCATTCACACATTATCCAGAAGAAC
	241'	AAAAAAGAAAATGTCACACAACCTAACAAACCACACCTTCACTCACAGAAATCATGTGGCT
	241''	AAAAAAGAAAATGTCACACAACCTAACAAACCACACCTTCACTCACAGAAATCATGTGGCT
	301'	TAACGATGAAACGTAGAGTTTCTCTTGGTGTCTG
	300''	TAACGATGAAACGTAGAGTTTCTCTTGGTGTCTG

**B**

HNI	1'	ACGGAGCAAAGACGGACAAGCTGGTGAAGATAAGCCAAACAGGCATATTTATGCGGTGAT
<i>Da</i>	1'	ACGGAGCAAAGACGGACAAGCTGGTGAAGATAAGCCAAACAGGCATATTTATGCGGTGAT
	61'	TCTCCCCTCGTCTCAGGAATTTGAGTTCTTGGATTCTCTTGAACAGTGAAGCAGATGA
	61''	TCTCCCCTCGTCTCAGGAATTTGAGTTCTTGGATTCTCTTGAACAGTGAAGCAGATGA
	121'	GCCATTCATTTTGTTCAGTGATAAAGGGGGTGGCAATCATATTTGAGCTGGGTTTTTGCA
	121''	GCCATTCATTTTGTTCAGTGATAAAGGGGGTGGCAATCATATTTGAGCTGGGTTTTTGCA
	181'	GTGTGGCCTCAAATCAACCCCTTCTCACAGCAGACAATAGAAAACAGGAAGTAAACAGA
	181''	GTGTGGCCTCAAATCAACCCCTTCTCACAGCAGACAATAGAAAACAGGAAGTAAACAGA
	241'	TTGTGTGGAACAGAAGCTGCATTATGATGGGAATGTTTCCACCTGCACAGCAAATTCAA
	241''	TTGTGTGGAACAGAAGCTGCATTATGATGGGAATGTTTCCACCTGCACAGCAAATTCAA
	301'	CCGCATCCTGTACTGCATTCTGATGAATAAAAC'TCCAGCACCTTGTGGATTCTAGTGAAC
	301''	CCGCATCCTGTACTGCATTCTGATGAATAAAAC'TCCAGCACCTTGTGGATTCTAGTGAAC
	361'	ATTAATTGTGCATGAAAATGATCAGAAGCTGTGACTGCCTAAACBAACAGCGAGTGTAC
	361''	ATTAATTGTGCATGAAAATGATCAGAAGCTGTGACTGCCTAAACBAACAGCGAGTGTAC
	421'	TTTGATTTATAGTCAGACTCCTGACTGGCA
	421''	TTTGATTTATAGTCAGACTCCTGACTGGCA

図1-6 *Da*遺伝子近傍のSTSマーカーの塩基配列と多型

*Da*遺伝子近傍に存在する2個のSTSマーカー、stsB07-3 (A) とstsM02-5 (B) の塩基配列。HNI系統を上段に、*Da*変異体を下段に示す。青で囲んだ部分に両系統間の多型が確認できる。stsM02-5 (B) の赤字は、*Hinf* I制限酵素切断部位であり、HNI系統の2番目の*Hinf* I認識配列が多型部位と重なっていることから、HNI系統と*Da*変異体間での*Hinf* I制限断片長多型 (RFLP) が期待される (実際のPCR-RFLP電気泳動像は図1-4Cを参照)。緑で示した部分は、STS primer配列である。



幅する形でエクソン部分にprimerを設定した。メダカで単離されていない遺伝子に関しては、次の方法で遺伝子断片を単離した。DNAデータベースからヒト、マウス、ニワトリ、ゼブラフィッシュなどの他生物種の塩基配列を得て、それぞれをアラインした。できる限りイントロンを内部に含むような形で、保存されているエクソン領域にprimer setを設定した。Lyons *et al.* (1997) を参考にして、幾つかのCATS (comparative anchor tagged sequences) マーカーも使用した (表1-5)。これらのprimer pairを使用してHNI系統と*Da*変異体のゲノムDNAをテンプレートとしたPCR法を行った。PCR反応条件の最適化をLyons *et al.* (1997) に基づいて、アニーリング温度やマグネシウムイオン濃度を変えて行い、シングルバンドを増幅する条件を探した。増幅されたPCR産物は、ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) でダイレクトシーケンシングした。反応産物はApplied Biosystems Model 377 DNA sequencerで泳動し、解析を行った。両方の親系統の塩基配列を決定した。PCR産物が目的の遺伝子断片を増幅しているか否かを確認するためにBLASTNプログラムでホモロジーサーチを行った。両系統の塩基配列を比較することにより (表1-4)、制限断片長多型 (RFLP) を検索した (図1-8)。RFLPを示さなかった遺伝子 (*eng2*, *asha*, *MYH2*) に関しては、single nucleotide polymorphism (SNP) 部位がprimerの3'端になるよう、primer setをHNI系統の塩基配列をもとに設定し直した。これらのマーカーはdominantなHNI系統特異的マーカーとして増幅した。*pax6*と*ashb*に関しては、最初のprimer setではシグナルが弱かったため、新たに内側にprimer setを設定し直した (表1-5)。

## 5. 遺伝的連鎖地図の作成

メダカ遺伝的連鎖地図の作成には42個体のバッククロス個体を使用した。全ての多型性マーカーに関して、分離比が1:1から外れていないか否かを $\chi^2$ 乗法で検定した。連鎖解析の大部分はMAPMAKER/EXP 3.0 (Lander *et al.* 1987) プログラムを使用して行った。まず、Two-Point analysis (LOD値3以上、組換え頻度0.3以下) で大まかな連鎖群を同定した。次に、それぞれの連鎖群についてFull multipoint analysis (Lander and Green 1987) をLOD threshold = 2.0で行い、マ



ーカーのオーダリングを行った。100:1のオッズでオーダリングできなかったマーカーに関しては、最も尤度の高い位置にオーダリングをした。オーダリングのエラーに関しては、MAPMAKERのerror detection functionを使用して調べた (Lincoln and Lander 1992)。エラーの可能性が示唆された場合には、ゲルの写真を確認し、再度タイピングを行いデータを訂正した。最終的なマーカーの順序は、オリジナルのマーカー順序の尤度と、ある隣り合うマーカーの順序を入れ換えた時の尤度を比較するRIPPLEコマンドを用いて確認を行った。メダカでは、組換えを起こした近傍の領域で組換えが抑制されるという”干渉”という現象が、いくつかの染色体で確認されている (Naruse and Shima 1989)。従って、組換え頻度 (%) の遺伝的距離 (cM) への変換には、干渉を考慮に入れたKosambiの地図作成関数を使用した。Da遺伝子近傍の領域の連鎖解析は、625個体のバッククロス個体を用いて同様の方法で行った。

## 6. メダカゲノムの遺伝的距離の推定

遺伝子地図を利用して染色体歩行を開始する前に、その領域の遺伝的距離と物理的距離を対応付けておくことは重要である。従って、本研究で作成した遺伝的地図の情報を利用してメダカにおける遺伝的なゲノム長の推測を行った。使用した Hulbert *et al.* (1988) の関数を以下に示す。 $G = N(N-1)X/K$ ,  $G$ : ゲノム長 (cM),  $N$ : マーカー数,  $X$ : 使用したLOD値の時に連鎖が確認できる最大の遺伝的距離 (cM),  $K$ : 使用したLOD値で連鎖が確認されたマーカーの組合せ数。ここで、 $X$ と $K$ は、LOD値に依存した値である。 $\theta$ 値のみはChakravarti *et al.* (1991) のmethod 3に基づいて使用した。具体的には、LOD値が3で、調べた個体数が42個体の時の $\theta$ 値は、 $3 = 42\{\theta \log_{10} 2\theta + (1 - \theta) \log_{10} 2(1 - \theta)\}$ から、 $\theta$ 値は0.22となる。メダカでは干渉が存在することから、Kosambiの地図作成関数を利用すると、 $X = 100 \times \{1/4 \ln(1 + 2 \times 0.22) / (1 - 2 \times 0.22)\}$ から、 $X = 23.79$ となる。 $N$ と $K$ については、各々調べた値を代入して計算した。

## 7. 既存の連鎖地図との対応関係



本研究で作成したメダカ遺伝的連鎖地図と既存の地図 (Wada *et al.* 1995) の対応付けを行うために、既存の地図作成時に使用された個体と同じバッククロス個体のうち40個体を使用した。20個体はAA2雌とHNI雄とを掛け合わせ得られたF1雄個体をAA2雌にバッククロスしたもの、残りの20個体はHd-rR雌とHNI雄とを掛け合わせ得られたF1雄個体をHd-rR雌にバッククロスしたものであった (表1-1)。これらの個体から抽出したDNAを使用して、我々の地図上の65個のマーカについてタイピングし、既存の地図上のマーカとの連鎖関係を調べ、対応付けを行った。連鎖解析とマーカのオーダリングは上記と同様の方法で行った。6本の連鎖群 (LGs II, IV, XI, XV, XX と XXI) に関しては、既存の地図上のマーカを我々の地図上にマップし、対応付けが正しく行われていることを確認した。



## 結果

### 1. マーカーとその多型性

遺伝的連鎖地図を作成するためには、多くの多型性マーカーを得ることが必須である。多型性の程度は、使用するマーカーや系統によって様々である。本研究では4種類のマーカー (RAPDマーカー、RAPDマーカーに由来するSTSマーカー、既知遺伝子、表現型マーカー[*Da*])を使用して、HNI系統と*Da*変異体間での多型解析を行った。

#### 1-1. RAPDマーカー

RAPDマーカーの多型性はRAPD-PCR産物を泳動することにより、増幅されたバンドの有無によって確認された (図1-4)。131個のRAPDプライマーについて両系統間の多型を調べた結果、59個 (45%) のプライマーから計133本のHNI系統特異的なバンドを得ることができた (表1-2)。これらのHNI系統特異的RAPDマーカーを連鎖解析に使用した。

#### 1-2. STSマーカー

16個のRAPDマーカーのSTS化を行った (表1-3)。HNI系統と*Da*変異体間のDNA塩基配列多型は、制限酵素処理や両系統の塩基配列を決定することによって調べた (図1-4C ; 図1-6)。その結果、全てのSTSマーカーで多型が確認された。7個のマーカーについては両系統の塩基配列を決定した。BLASTNプログラムを使用してこれら16個のSTSマーカーの相同性検索を行った結果、*stsOPX06-2*のみがマウスのET putative translation product mRNA (AF015191) と89.2% (102塩基) の相同性を示した。*stsOPX06-2* (図1-7: 矢印) を除いた他のanonymousなSTSマーカーは平均30 bpに1個の多型 (塩基置換と挿入/欠失の両方を含めて) を有していた (表1-4 ; 図1-7)。

#### 1-3. 既知遺伝子

15個の既知遺伝子 (表1-5) についてprimerを設定し、PCR法を用いてゲノム



表1-3 STSマーカー

Marker Name	Accn. No	Primer pairs	Size	Polymorphism	LG
stsB07-3	AB030355	CCAGATCCACCCCAGCAGAA	445	a	VIII
	AB030356	CAGGAGTTTCCTGACATGCG <i>GCTCACTGTTCTGGATCATC</i>	335/334	b	
		<i>CACGACACCAAGAGAAACTC</i>			
stsM02-5	AB030357	ACGGAGCAAAGACGGACAA	451	a	VIII
	AB030358	TGCCAGTCAGGAGTCTGACTA			
stsM63-1	AB030359	TTGGGTGGGCAGGAAAGAT	405	c ( <i>Hin</i> f I)	VIII
		ACGCAAAAAGCAACACAGGG			
stsM90-3	AB030360	CCTGCAGCATAGAAGCCTTTG	491/475	b	VIII
	AB030361	AAGGGAATGTCCAAAGGAGC			
stsNTU29-3	AB030362	GCTGACTCCTGGTATGAAG	773	c ( <i>Sfa</i> NI)	VIII
		GAACTCTATAGCAGGTGAGC			
stsOPQ05-1	AB030363	AATCTGCCAGGATCCAGTCA	556	c ( <i>Hin</i> f I)	I
		CCTACGGAGCGGTCATTTCTGTAG			
stsOPR04-1	AB030364	GCAGGCATCATTGATAATGC	458	c ( <i>Alu</i> I)	I
	AB030365	GAGTTGCTGCAAGGTCAAAG			
*stsOPS11-1	AB030366	CTGCTCCACCGTAGAAAGCC	341	a	VIII
		CACTCGTTCAGGTCGTTGAG			
		<i>CGAAGAACTATGTGCTTTCC</i> <i>TAGGACCACTGTGGACTTAG</i>	629/587	b	
stsOPU19-2	AB030368	CATCATTGAGTCCCCATAA	418	a	XVI
		TGGAGGGACAAGATGCACAG			
stsOPU19-3	AB030369	GTTACTCTGAGGGGACAAAC	310	c ( <i>Msp</i> I)	IX
		ATGACAAAGGACGGCGAACG			
stsOPU19-4	AB030370	CGCTGAAATCAGGCTCAGG	470/418	b	IX
		AAAGAGGCAGAGAGGATCTC			
stsOPV10-1	AB030371	GGTGTGATACGTCTTATAGG	493	c ( <i>Msp</i> I)	IV
		GGAACAATCAGGGCTGAGTG			
*stsOPV10-2	AB030372	GAAGGAAACAGCCTCATCAC	454	c ( <i>Alu</i> I)	VIII
		GTTCCAGTTTCCTACAGCTG			
*stsOPX06-1	AB030373	GAGACAATCCTTTCCATTG	612	c ( <i>Alu</i> I)	VIII
		GCTCCAGATCCGCAAAGTGC			
stsOPX06-2	AB030374	TGAAGGATGGCAGGCGTGTC	669	c ( <i>Bam</i> HI)	unlinked
	AB030375	GAGGCGTTCATCACTCCAG			
stsOPZ20-3	AB030376	GAATACGTGTGGAGTCAACC	388	c ( <i>Ssp</i> I)	VIII
	AB030377	GAAGCATCCTTAGGAATGGG			

Primer pairs: 斜体で示したprimer pairsは、連鎖解析には使用せず、シーケンス時に使用した。

\*: これらの3個のマーカーは、Da 遺伝子近傍の領域の高解像度マッピングにのみ使用した。

a: HNI系統からのみ増幅されるHNI系統特異的マーカー

b: PCR増幅産物のsize多型

c: PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)



DNAから遺伝子断片を増幅した。さらに、それぞれの断片の塩基配列を決定した。*wnt5/5b*, *wnt8like*, *shh* (図1-8), *pax3*, *tyr*, *arom*, *LMP2*についてはメダカの塩基配列をもとにprimerを設定したが (*wnt5/5b*, *shh*, *pax3*, *tyr*, *arom*, *LMP2*はDNAデータベースに登録されている配列より、*wnt8like*はYokoi personal communication)、全て目的の遺伝子断片が増幅された。他の生物種の塩基配列情報を参考に設定したdegenerate primerやCATS primerを用いて増幅された8個のPCR産物のうち、*pax6*と*T*はDNAデータベースのメダカの塩基配列と完全に一致した。残りの6個の遺伝子 (*hoxA9*, *eng2*, *fgf3*, *asha*, *ashb*, *MYH2*) については、他生物種のオーソログと塩基配列レベルで80%以上のホモロジーを示した(表1-5)。9個の遺伝子断片はイントロンを含んでいた。*wnt8like* (Yokoi personal communication), *arom* (Tanaka *et al.* 1995), *LMP2* (Namikawa-Yamada *et al.* 1997) に関しては、エクソン-イントロンの構造はメダカで既に明らかとなっており、今回、目的のイントロンを含む領域が増幅されていた。他の6個の遺伝子 (*wnt5/5b*, *T*, *pax6*, *pax3*, *fgf3*, *MYH2*) についてはゲノム上の遺伝子構造がメダカではまだ知られていなかったが、イントロンが含まれる位置は他生物種のオーソログのそれと完全に一致していた。また、9個の遺伝子全てにおいて、エクソン-イントロン境界のスプライシングのドナーとアクセプター部分は”GT-AG則”に従っていた。全てのイントロン中に多型が確認され、その頻度は平均33 bpに1個(塩基置換と挿入/欠失の両方を含めて)であった(表1-4; 図1-7)。これはanonymousなSTSマーカの頻度(平均30 bpに1個)と非常に近い値であり、イントロンとanonymousなSTSマーカを含めた非コード領域の平均多型頻度は31 bpに1個と計算された。それに対してコード領域では平均120bpに1個の多型を有しており、期待された通り非コード領域と比較してその頻度は低いものであった(表1-4; 図1-7)。コード領域の27個の多型は全てsingle nucleotide polymorphism (SNP)であり、その内3個(11%)のみが非同義置換であった。非同義置換は*wnt8like*に1箇所、*tyr*に1箇所、*fgf3*に1箇所確認された。これらの遺伝子が厳密に多生物種のオーソログであるか否かは解らないが、以上のことから考えると、今回調べた全て、もしくは大部分の遺伝子が、実際に発現し機能している遺伝子であることが示唆された。

## 2. 遺伝的連鎖地図



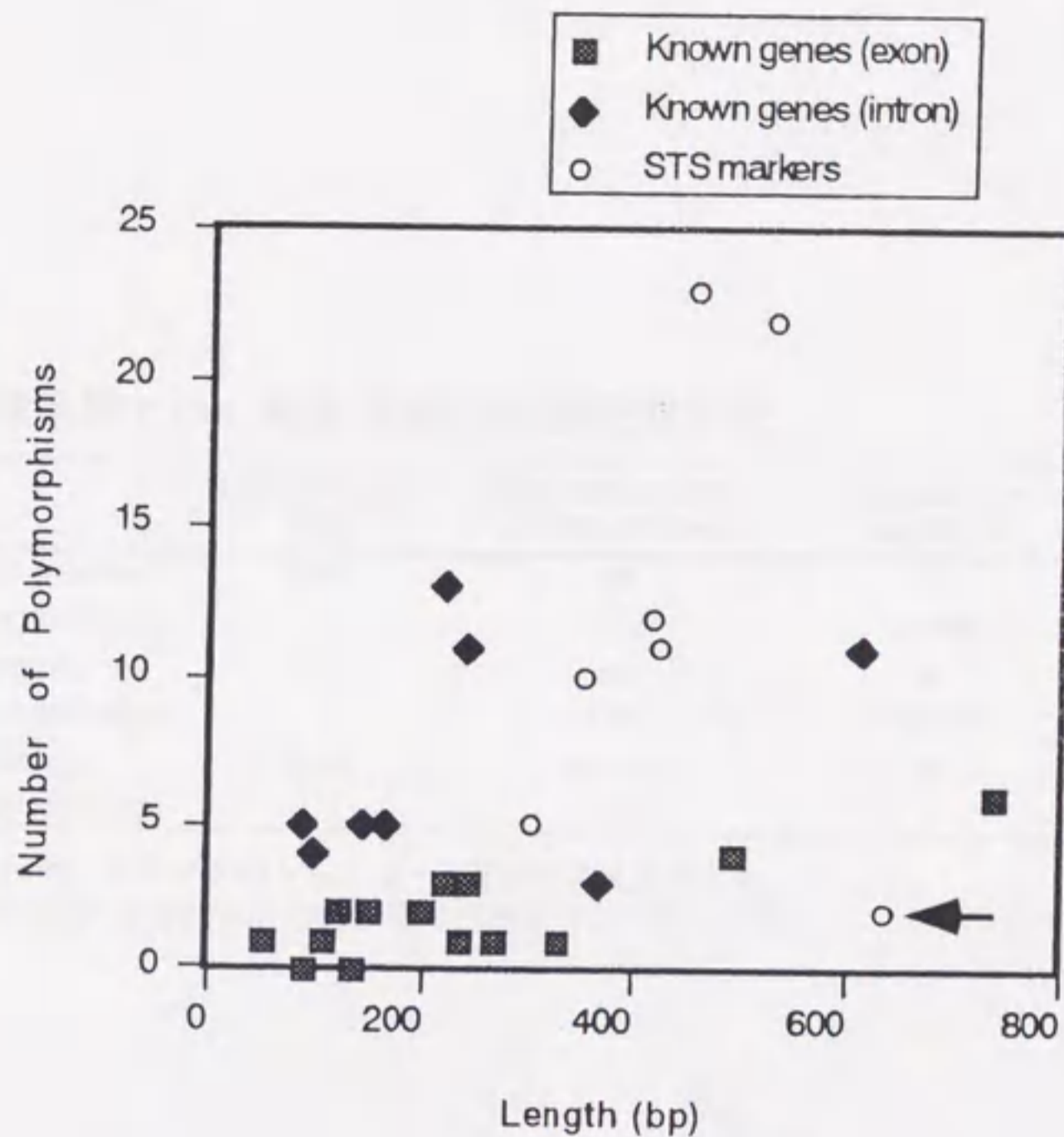


図1-7 HNI系統と*Da*変異体間における塩基配列多型

STSマーカー (○) と、エクソン (■)、イントロン (◆) におけるHNI系統と*Da*変異体間の塩基配列多型。横軸に塩基配列長、縦軸に認められた多型の数を示す。多型は、SNP (single nucleotide polymorphism) と挿入/欠失の両方を含めた。既知遺伝子と相同性を示したSTSマーカー (stsOPX06-2) を矢印で示す。各々のマーカー種の多型頻度については表1-4 参照。



表1-4 HNI系統とDa 変異体間の塩基配列多型

	Size compared (bp)	Single Nucleotide Polymorphisms	Insertions or Deletions	Total Number of Polymorphisms
Anonymous STS markers	2446	77	5	82
Frequency (poly./bp)		1/32	1/489	1/30
Known genes (intron)	1887	50	8	58
Frequency (poly./bp)		1/38	1/236	1/33
Known genes (exon)	3241	27 (3)	0	27
Frequency (poly./bp)		1/120	0	1/120

Known genes (exon): エクソンのうち、コード配列のみを比較した。  
 Single nucleotide polymorphisms: 非同義置換の数をカッコ内に示す。



A

```

HNI 1' TGGCGATCTCGGTGATAAAACAATGGCCCGGGGTGAAGCTGCGGGTCACTGAGGGCTGGG
*****
Da 1" TGGCGATCTCGGTGATAAAACAATGGCCCGGGGTGAAGCTGCGGGTCACTGAGGGCTGGG

61' ATGAGGACGGCCACCACTTCGAGGAGTCCCTTCACTACGAGGGCAGGGCCGTGGACATCA
*****
61" ATGAGGACGGCCACCACTTCGAGGAGTCCCTTCACTACGAGGGCAGGGCCGTGGACATCA

121' CCACGTCAGACAGGGACAAGAGCAAGTACGGCACCCCTGTCCAGGCTGGCGGTGGAAGCTG
*****
121" CCACGTCAGACAGGGACAAGAGCAAGTACGGCACCCCTGTCCAGGCTGGCGGTGGAAGCTG

181' GGTTCGACTGGGTCTACTATGAGTCCAAAGCGCATCCACTGCTCTGTGAAAGCA
*****
181" GGTTCGACTGGGTCTACTATGAGTCCAAAGCGCATCCACTGCTCTGTGAAAGCA

```

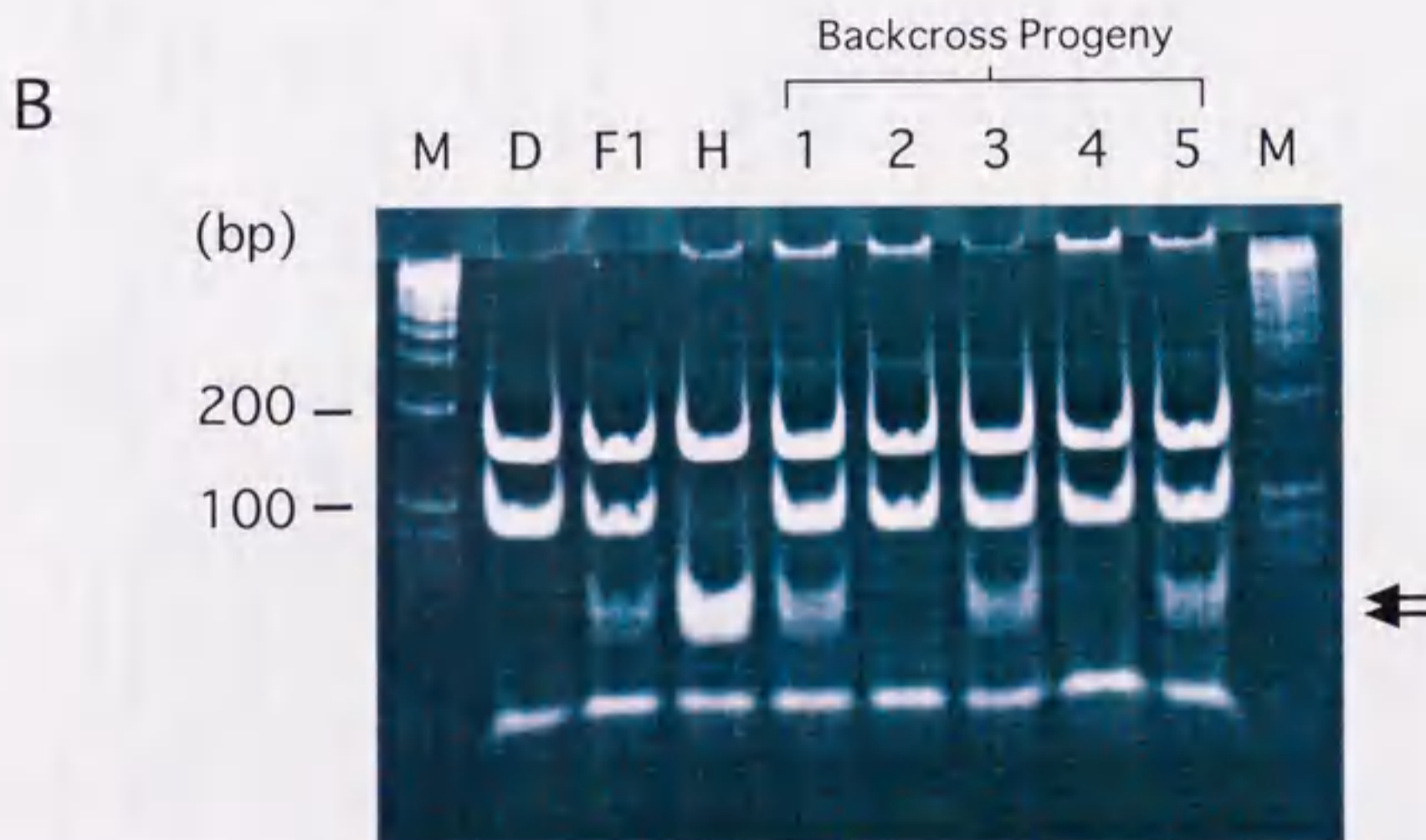


図1-8 *shh*遺伝子断片に存在するRFLP多型

A: *shh*遺伝子断片の、HNI系統（上段）と*Da*変異体（下段）の塩基配列。全てタンパク質をコードする領域である。青で囲んだ部分に多型（同義塩基置換）が確認できる。赤字は、*Rsa*I制限酵素切断部位であり、HNI系統の2番目の*Rsa*I認識配列が多型部位と重なっていることから、HNI系統と*Da*変異体間での*Rsa*I制限断片長多型（RFLP）が期待される。緑で示した部分は、primer配列である。B: タイピング泳動像。*shh*遺伝子断片をPCR法で増幅後、*Rsa*Iで切断して泳動した。両系統間で期待されるRFLPが確認された（矢印）。D: *Da*変異体、H: HNI系統、F1: HNI系統と*Da*変異体を掛け合わせたヘテロ個体、M: サイズマーカー。



表1-5 既知遺伝子

Gene	Accn. No	Primer Origin	Primer Pairs	Fragment Size (bp)	Intron (bp)	Polymorphism	LG	Homology	Location in Human	Location in Zebrafish (LG)
wnt5b	AB030479 AB030480	medaka medaka	AGCGGTTTCCTCACCTGCAAC CATTTCTGGCCGTGGATTGGGGTC	698/694	604/600	a (Mvr I)	4	medaka WNT 5B 97% (47 nt)		wnt5 4
wnt5fike		medaka provided from H.Yokoi	CTAGAGCTGCTGCAATCTG ACACGTGTTACTGAGAACC	611	83	a (Hln I)	XII	H. Yokoi pers. Comm.	WNT5B 10q24-q24	wnt5 4
shh (sonic hedgehog)	AB030473 AB030474	medaka Z97019, AB007129	TGGCATCTGGGTGATAAAC TGCITTCACAGAGCAGTGGATG	236		a (Psa I)	VIII	medaka shh 98% (174 nt)		wnt5 14
T (brachyury)	AB030475 AB030476 AB030477 AB030478	other species (degenerate primer) other species (degenerate primer)	GGAYGAYCTCTYAGCGGGTGGGA CCCAATCMCCGTTACRATTTC TTTGGCTGGGAAATCCGAGACAG ATSCDDTCYGMKCCCATCTGTTC	490/490 408	212/216	a (Dde I)	IX	medaka Me-Tam 100% (231 nt)		shh 7
pax6 (paired box gene-6)	AB030472	(degenerate primer)	GGATCTGCACCAACGACAAAC TTTCACTAGCCAGGTTGCGG	416	364	a (Nco I)	XI	medaka Pax6 100% (87 nt)	PAX6 11p13-p13	
pax3 (paired box gene-3)	AB030469 AB030470	medaka AB017150	AGATGGAATCTGCGACAGG CCTTGGTGGTTTTCCTCG	301/299	159/157	a (Dde I)	b	medaka Pax-3 96% (104 nt)	PAX3 2q36-q36	
houx4 (homeo box region A)	AB030464 AB030465	Lyons et al. (1997)	AAAAAGGCGTGTCCGTACAC TCATCTACGGTTCTGGAAC	157		a (Eco R I)	IX	pufferfish HOXA-9 (FHXA-10) 92% (110 nt)	HOXA9 7p15-p14	houx4 12
eng2 (engrailed-2)	AB030460 AB030461	Lyons et al. (1997)	CCCGAAACCAAAAGAAAG GTTCTGGA4ACCAATGTTGATC TTCTGCCGCTCTGCTCGTCAG AGACCACGGACGGCCTTCAAC	186 92		b	VIII	newt engrailed 86% (101 nt) zebrafish eng-2 81% (134 nt)	EN2 7q36-q36	eng2 7
fgf3 (fibroblast growth factor 3)	AB030462 AB030463 AB030464 AB030465	other species (degenerate primer) other species (degenerate primer)	CKGRAGATAYCTGGCYATG TCATGGTYTGTGKCC AGAAGATGAGCAARGTGGAG CAGAACCCAGYGGTAAAGTC AAGATGAGCAAAAGTGGAGACA GTGCTAGGAGCCTTCATCA	435 256 204	137	a (Eae I)	XII	zebrafish fibroblast growth factor 3 81% (113 nt) chicken achaele-scute homologue (ASH) 88% (209 nt) zebrafish achaele-scute homologue a (ASH) 82% (197 nt)	Fgf3 11q13.3-q13.3	fgf3 7
ashb (achaele-scute homologue b)	AB030458 AB030459	other species (degenerate primer)	AGAGACAGCGCTCSAGC GARTGMGGWACTCCGG GAACTCTCAGATGCAAGC GGCTGAGTAGCTGTTGGAG	358 315		b	a	pufferfish achaele-scute homologue 1 (Fash) 82% (222 nt) zebrafish achaele-scute homologue b (ASH) 82% (222 nt)	ASH1 12q22-q23	ashb 4
tyr (Tyrosinase)	AB030477 AB030478	medaka D29686	TCAGCCATCTCACCAGAGTGGTC GATTTTGCATCTCCTGCTCCAG	780		a (Bsm I)	XVIII	medaka tyrosinase 96% (725 nt)	TYR 11q21-q21	
arom (cytochrome P-450 aromalase)	AB030454 AB030455	medaka D82969	ATGCACCGCACAGATCTCCAC AGAAGCTATGCTGAGATGGTCAG GGCTGATCGAGAGTGTCTGCA	521/523	265/237	a (Sma I)	XII	medaka cytochrome P-450aromatase 99% (238 nt)	CYP19 15q21-q21	
LMP2 (low molecular mass polypeptide 2)	AB030466 AB030467 AB030468	medaka Namikawa-Yamada et al. (1997) Lyons et al. (1997)	CATCTCAGCCGATGGTCTGAG GAACCCAGCCTCATCAACC TGGTCTCTGCTGCTTCTTC CGTGAGTCAACCCGTTCCCTT CATGGCAGCCTGAAATATCAA	612 263/262 103	480 93/92	a (Hln I) b	IX VI	medaka LMP2 97% (86 nt) bluefin tuna skeletal myosin heavy chain 96% (130 nt)	PSMB9 5p21.3-p21.3 MYH2 17p13	

Primer origin: primer pairsを設定する際に参考にした配列のAccession numbers, または参考文献。  
Primer pairs: 転体で示したprimer pairsは、通訳時には使用せず、シーケンス時に使用した。

Homology: HNI系統の塩基配列に対して相溶性検索を行った。

Location in humans: ヒトの遺伝子座位については、ホームページ (<http://gdbwww.gdb.org/gdb/>)、もしくはLyons et al. (1997) を参考にした。

Location in zebrafish: Zebrafishの遺伝子座位については、Postlethwait et al. (1998) を参考にした。

a: PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)によるHNI系統からのみ増幅されるHNI系統特異的マーカー。



計163個の多型性マーカーで、42個体のバッククロス個体のタイピングを行った。メンデル遺伝から期待される1:1の比から $\alpha=0.05$ で外れるマーカー数は8個(7個は図1-9に\*で示したもの、残り1個はunlinkのマーカー)であった。この数は、5%の確率で期待される値(8.2)と非常に近い値である。2個のマーカーはLGVにクラスターとして存在していた(図1-9)。

最終的に、163個のマーカーのうち146個(89.6%)が26本の連鎖群に分かれた(図1-9)。これは、メダカの染色体数24本( $2n=48$ )より2本多いものであった。これらの連鎖群の遺伝的距離は0.0~58.5 cMで、全ての連鎖群の合計は604 cMであった。それぞれの連鎖群は2~15個のマーカーより成り、マーカー間の平均距離は $5.2 \pm 5.3$  cM (S.D.)と計算された。

$D_a$ の含めた変異体のポジショナルクローニングを行う際に、遺伝的距離と物理的距離の対応関係を把握しておくことは非常に重要である。1 cMが何bpに相当するかという情報は、染色体歩行を行う上でのよい目安となる。そこで、まずメダカゲノムの遺伝的距離を今回作成した連鎖地図をもとに推測した。今回使用したマーカー(連鎖していないものも含めて)によってカバーされたと考えられる領域の遺伝的距離の合計は次のように計算される。連鎖地図上のマーカーで覆われた領域の遺伝的距離(各連鎖群の遺伝的距離の合計)は、上記の通り604 cMである。これに、各連鎖群の末端からテロメアまでの距離(250 cM;  $2 \text{ テロメア} \times 5.2 \text{ cM} \times 24 \text{ 染色体}$ )、今回連鎖しなかった17個のマーカーと2本の過剰な連鎖群を含めたギャップ間の距離[452 cM;  $(17 + 2) \times 23.8 \text{ cM}$ , LOD値が3で、42個体の減数分裂を調べた時に連鎖が同定される最大の距離]を足すと1,306 cMとなる。これが今回使用したマーカーでカバーされる領域の遺伝的距離であり、雌の組換えに基づくゲノム長は最低でも1,306 cMはあると考えられた。しかし、今回使用したマーカーが全ゲノムをカバーしているとは考えにくいことから、この値は実際の距離を低く見積もっていることが示唆された。そこで、Hulbert *et al.* (1988)に基づき、メダカの遺伝的ゲノム長を推測することを行った。彼は、部分的なリンケージデータから、その生物種の遺伝的ゲノム長を推測する計算式を提唱した。この式を、今回作成した連鎖地図上のマーカーに応用して計算すると、メダカの雌の組換えに基づくゲノム長は、1,776 cMであることが推測された。これは各マーカーが全ゲノム上から全くランダムに得られたものであることを想定しているが、この値が正しいとした場合、今回



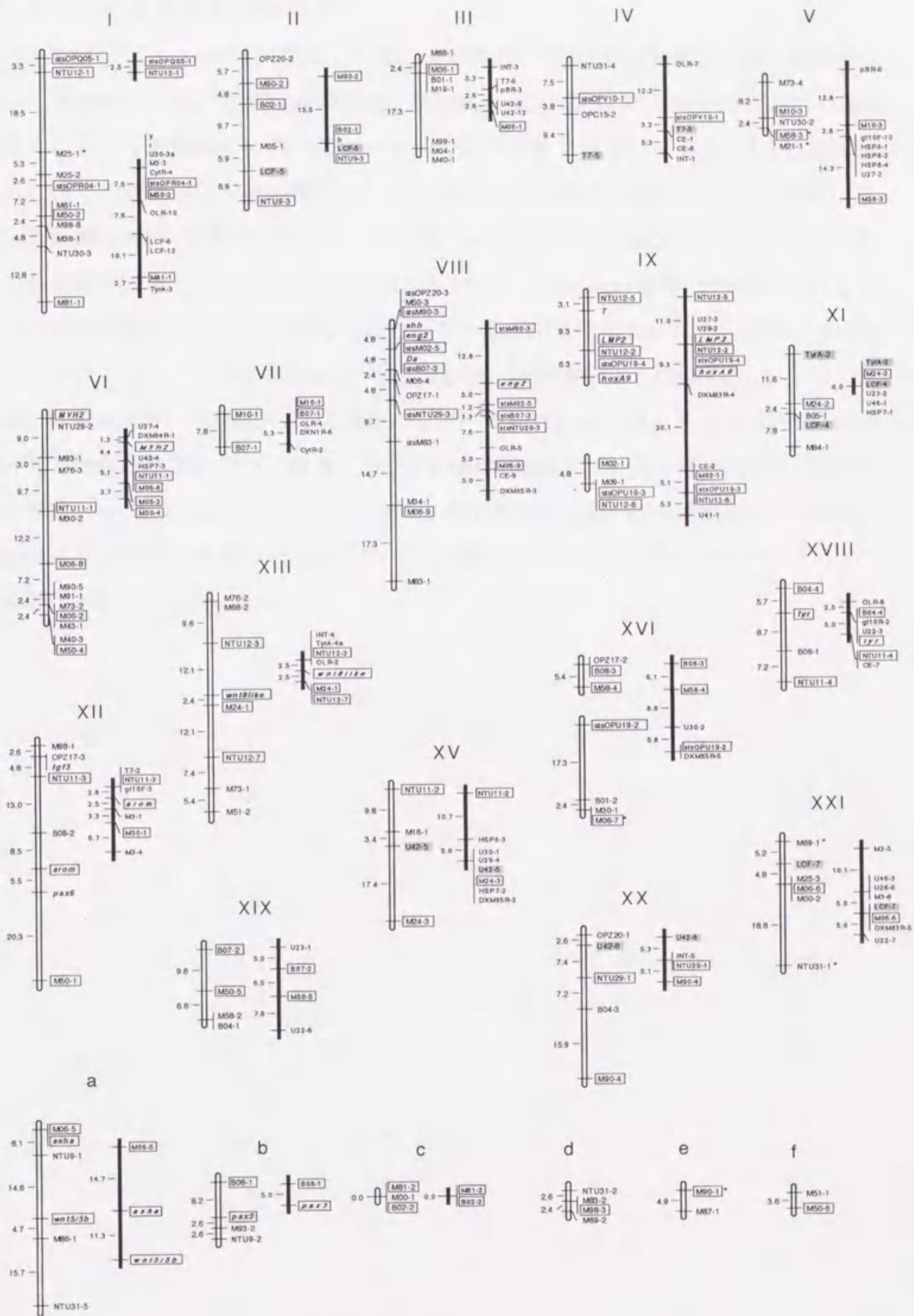


図1-9 メダカ遺伝的連鎖地図



### 図1-9 メダカ遺伝的連鎖地図

LGs I-XXIとLGs a-cについては、左側の連鎖群が、本研究で作成した雌の組換えに基づく連鎖群である。右側の連鎖群は、Wada *et al.* (1995) によって作成された雄の組換えに基づく連鎖群に、我々のマーカーの幾つかをマップして対応付けたものである。各々の連鎖群の左側の数字は、Kosambiの地図作成関数を使用して計算した遺伝的距離 (cM) である。マーカー名は各々の連鎖群の右側に示す。RAPDマーカーの名前は、primer名の後のダッシュに続けて、そのprimerを用いて増幅されてきたHNI系統特異的マーカーの番号を表わしている。STSマーカーについては、由来となるRAPDマーカー名の前に” sts” を付加した。既知遺伝子とDa座位は太字にした。Wada *et al.*の地図との対応付けに使用したマーカーはboxで囲んだ (白抜きのboxは本研究で得られたマーカーであり、灰色のboxはWadaのマーカーである)。連鎖群の番号は、Wada *et al.* (1995) に基づいている。LGs a-fの6個の連鎖群は、今回対応付けができなかったものである。1:1の分離比から外れていたマーカーについては米印 (\*) で示した。



使用したマーカーは全ゲノムの約74 % (1,306 cM / 1,776 cM) をカバーしていることになる。また、Uwa and Iwata (1981) のデータからメダカの物理的なゲノム長は800 Mbと計算されるが、この場合メダカでは1 cMが約450 kbに相当する計算になる。

### 3. 既存の地図との対応関係

既知の連鎖地図 (Wada *et al.* 1995) との対応関係を明らかにするために、計72個のマーカー [65個は本研究で新たに得られたマーカーであり (図1-9, white boxで示す)、残りの7個は既存の地図上のマーカーである (図1-9, shaded boxで示す)] について連鎖解析を行った。その結果、68個のマーカーを両連鎖地図上にマップすることができ、本研究で得られた26本の連鎖群のうち20本を、既存の地図の18本の連鎖群と対応付けることに成功した。LG IXとLG XVIについては、今回作成した地図上で2本に分かれていたものが、既存の地図上で1本に繋がった。LGs a-fに関しては、対応付けに使用したマーカーの全てが、既存の地図上のマーカーと連鎖を示さず、対応付けすることができなかった。マーカーのオーダーは、両方の連鎖地図上で全て一致しており、矛盾は見られなかった。

### 4. 遺伝子マーカーのマッピング

計15個の遺伝子断片を連鎖地図上にマップした (図1-9 ; 表1-5)。その結果、4組の遺伝子が、ヒトやゼブラフィッシュにおいても同じ染色体上に連鎖していることが分かった (図1-10)。 *shh* (図1-8) と *eng2* はメダカでLG VIII、ヒトはChr 7、ゼブラフィッシュはLG 7、 *asha* と *wnt5* はメダカでLG a、ゼブラフィッシュはLG 4、 *T* と *LMP2* はメダカでLG IX、ヒトはChr 6、 *fgf3* と *pax6* はメダカでLG XII、ヒトはChr 11上に連鎖して存在していた (表1-5)。

### 5. *Da* 遺伝子近傍の遺伝的地図



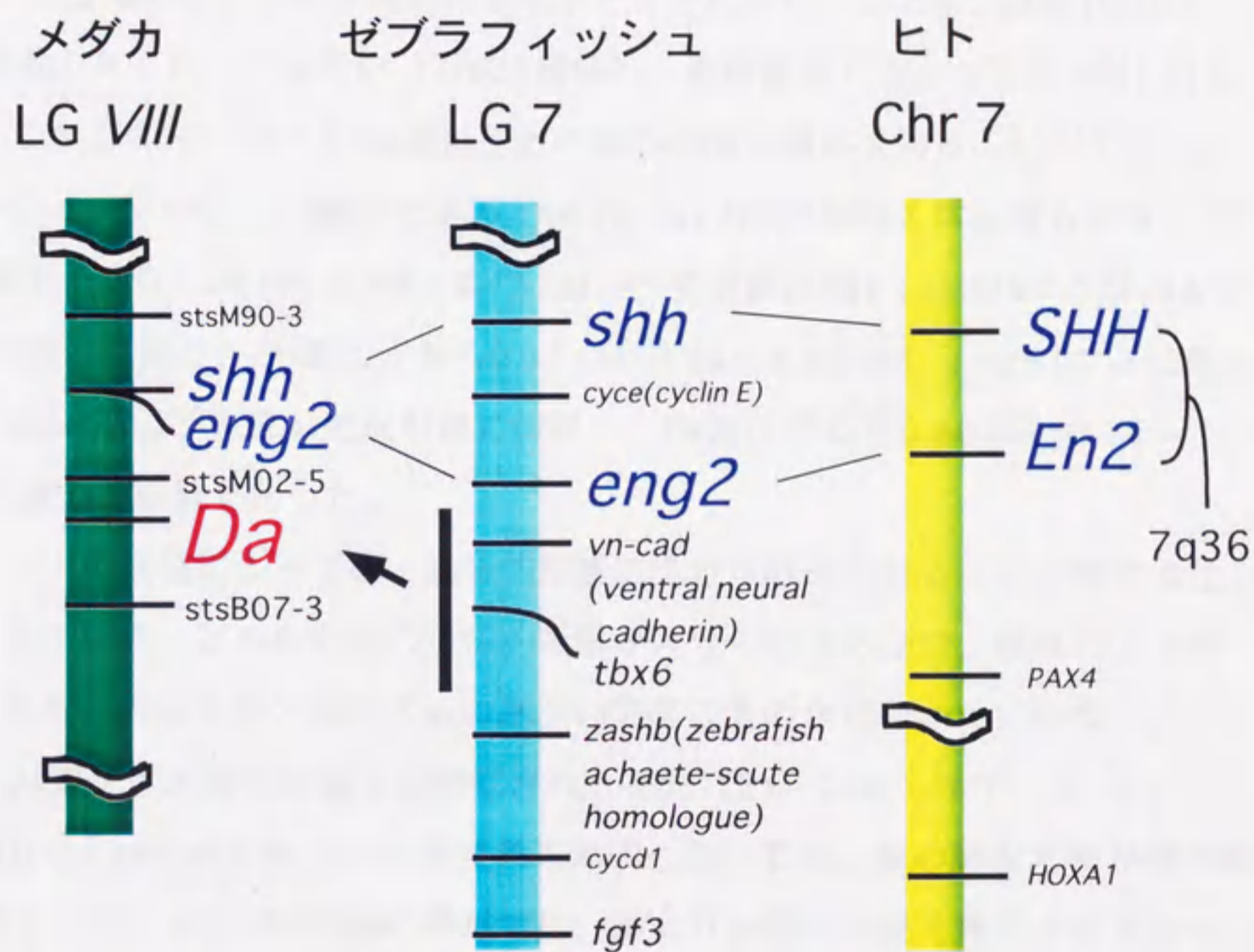


図1-10 メダカと他生物種において保存されている染色体領域の例

既知遺伝子をマップすることによって、4箇所に進化的に保存されている染色体領域を同定した。図には、LG VIIIの例を示す。*shh*と*eng2*は*Da*遺伝子の近傍にマップされた。*shh*と*eng2*の両遺伝子は、ゼブラフィッシュ (LG 7) やヒト (Chr 7) でも同じ染色体上に連鎖している。その他に、*asha*と*wnt5*、*T*と*LMP2*、*fgf3*と*pax6*などの領域でシンテニーが確認された。



42個体のバッククロス個体を用いた最初の連鎖解析において、*Da*遺伝子はLG VIIIにマップされた。また、4個のマーカー [*shh* (図1-8), *eng2*, *stsM02-5* (図1-4; 図1-6B), *stsB07-3* (図1-6A)] が *Da*遺伝子と密に連鎖していた (42個体で組換え個体なし; 各マーカー間の距離は連鎖地図上で0 cM; 図1-9)。このとき、*Da*遺伝子から各マーカーまでの遺伝的距離は、95%の確率で8.5 cM以内である。これらのマーカーと *Da*遺伝子との位置関係を明かとするために、さらに583個体のバッククロス個体のタイピングを行い (計625個体)、高解像度にマップした (図1-11)。その結果、これらのマーカーと *Da*遺伝子との間の組換え個体を得ることができた。各マーカーのオーダーは次の通りである: *shh* と *eng2* 間の組換え体は得られず、それぞれ *Da*遺伝子から2.64 cM (1.44 - 4.43 cM; 95%信頼区間); *stsM02-5* は *shh* や *eng2* と同方向に位置し、*Da*遺伝子から0.32 cM (0.04 - 1.16 cM); *stsB07-3* は他のマーカーとは *Da*遺伝子を挟んで反対側に位置し、*Da*遺伝子から0.80 cM (0.26 - 1.87 cM) の遺伝的距離であった。

ゲノム上の領域によっては、遺伝的距離に性差が認められることが様々な生物種で知られている。どちらの性の遺伝的距離が大きくなるのかは、領域によって異なる。これがどのようなメカニズムに基づいて起こるのかは分かっていない。この性差は、*Da*遺伝子近傍の領域でも確認された (図1-12)。2個の *sts* マーカー (*stsOPV10-2* と *stsOPX06-1*) で挟まれる領域においては、雄の組換え率が雌の約3倍であった。一方、LG VIIIの他の領域では、雄よりも雌の組換え率の方が高かった。

*Da*遺伝子を挟むかたちで存在する2個のマーカー (*stsM02-5* と *stsB07-3*) が得られたわけであるが、これらのマーカーを用いてゲノムライブラリーをハイブリダイゼーションでスクリーニングするためには、ゲノム上で1コピーのユニークな配列であることが望ましい。よって、ゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行った。その結果、2個のマーカーのどちらもメダカゲノム上でユニークな配列であることが確認された (*stsM02-5*; 図1-13、*stsB07-3*; data not shown)。

*Da*遺伝子近傍のマーカーを効率良く得るために、NIL (Near Isogenic Line; 9回のバッククロスを行うことにより、HNI系統のバックグラウンドで *Da*遺伝子近傍のみ *Da*由来となっているメダカ) 系統を利用してRAPD法を行った (図1-5)。200種類のprimerを調べたところ、*Da*遺伝子と連鎖する5個のマーカーを得ることができた (*stsOPS11-1*, *stsOPZ20-3*, *stsOPV10-2*, *stsOPX06-1*, *OPZ17-1*; 図1-5, 図1-11)。しかし、



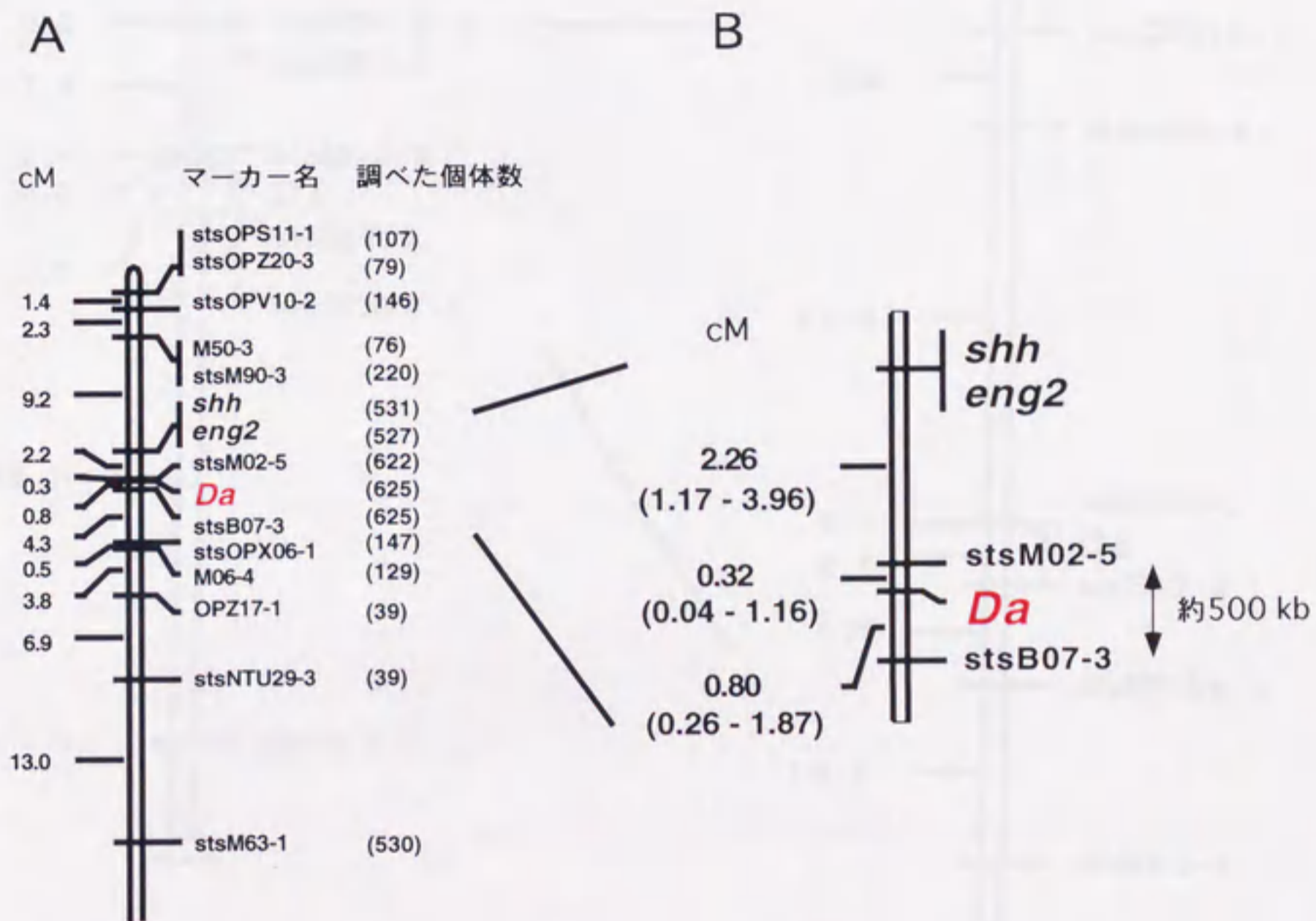


図1-11 *Da*遺伝子近傍の遺伝的地図

(A) LG VIIIの高解像度地図。マーカー間の距離はKosambiセンチモルガン (cM) で示す。括弧内の数字は調べたバッククロス個対数である。(B) *Da*遺伝子領域の詳細な地図。95%信頼区間を括弧内に示す。stsM02-5からstsB07-3間の遺伝的距離から推測される物理的距離を右に示す。



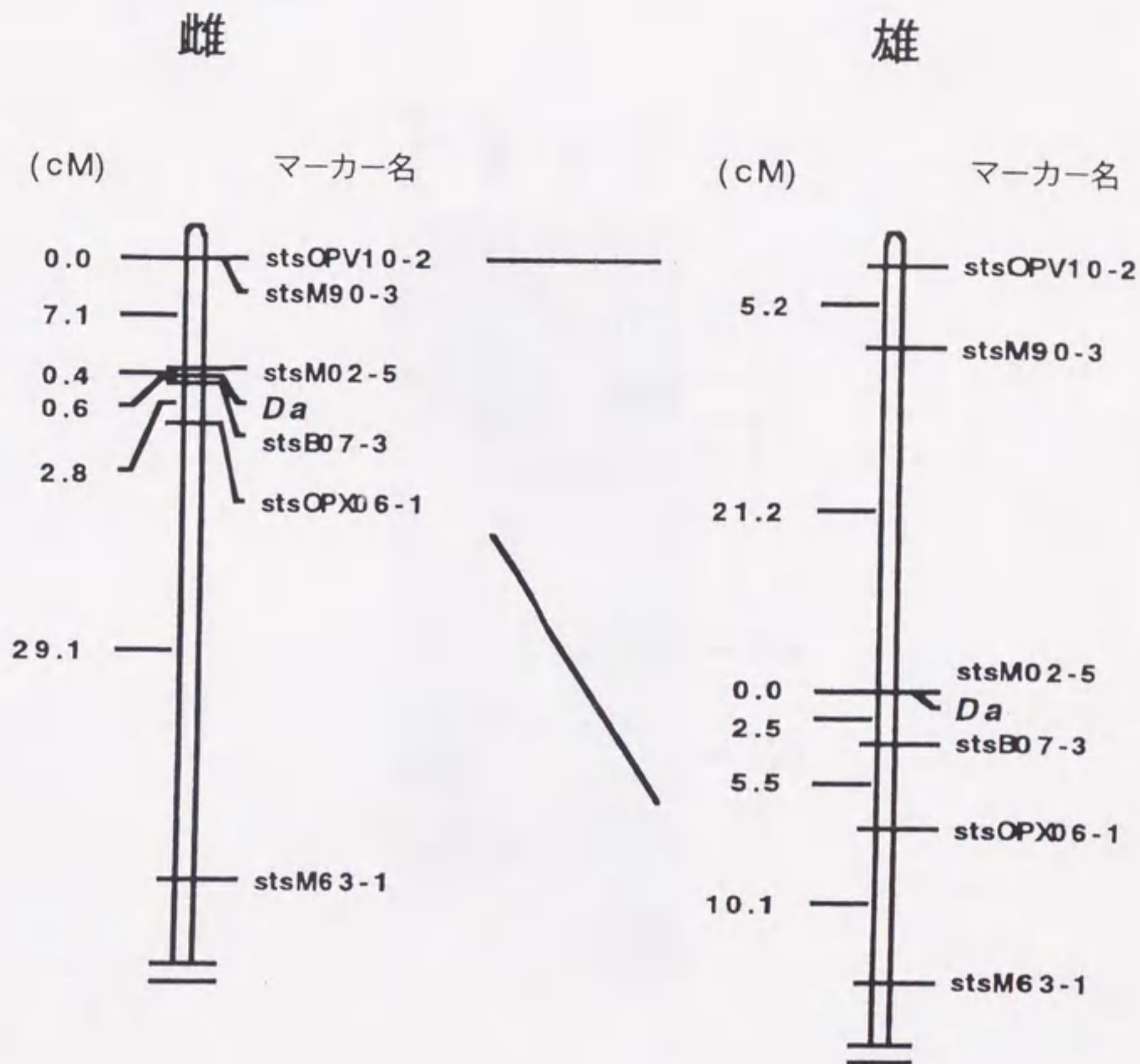


図1-12 組換え率の性差

左に雌の組換え、右に雄の組換えに基づくLG VIII (*Da*遺伝子近傍)の遺伝的地図を示す。stsOPV10-2からstsOPX06-1までは、雄の組換え率は雌の約3倍となっている。一方、stsOPX06-1からstsM63-1の領域では、雌の組換え率の方が高く、雄の約3倍となっている。このように、染色体上の領域によって、組換え率に性差が認められた。



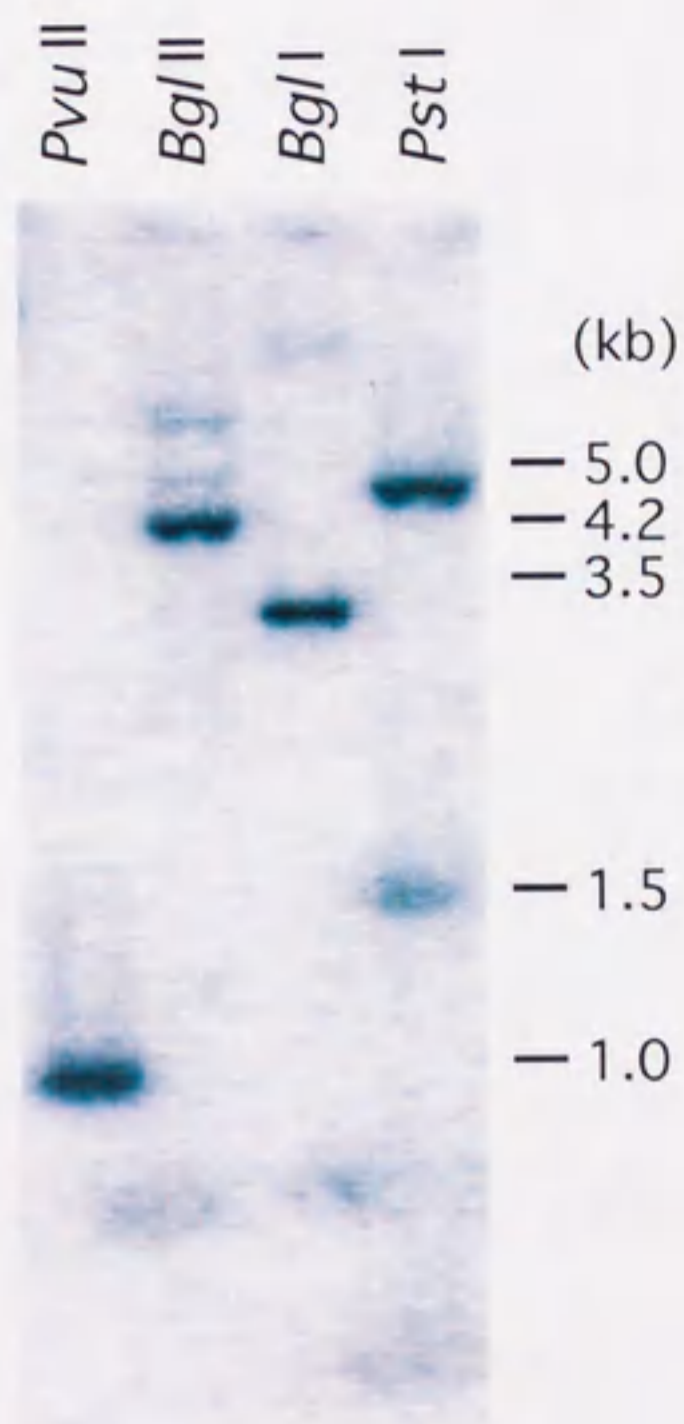


図1-13 stsM02-5をプローブとしたゲノムサザン  
ハイブリダイゼーション

HNIゲノムDNAを4種類の制限酵素で完全切断したものに対してstsM02-5をプローブとしたサザンハイブリダイゼーションを行った。それぞれ1本の強いバンドが確認される。このことから、stsM02-5はゲノム上に1個だけ存在するユニークな配列であり、ゲノムライブラリーのスクリーニングにプローブとして使用可能なことが示唆された。



stsM02-5やstsB07-3より*Da*遺伝子の近くに存在するマーカーは同定できなかった。  
NIL系統のLG VIII上の*Da*由来の染色体領域は、*Da*遺伝子を含めて24.8 cMにわたっ  
ていた (data not shown)。



## 考察

*Da*変異体の原因遺伝子を、ポジショナルクローニングの手法を用いて単離することを目的として、雌の組換えに基づくメダカ遺伝的連鎖地図を作成し、*Da*遺伝子をLG VIIIにマップした。*Da*遺伝子近傍については高解像度にマッピングを行い、*Da*遺伝子を挟むかたちで存在する2個のマーカールを得ることに成功した。また、既知遺伝子をマップすることによって、この領域がゼブラフィッシュやヒトのシンテニックな領域である可能性が考えられた。

遺伝的連鎖地図を作成するにあたり、まず最初に必要なのは、掛け合わせに用いた系統間の多型を同定することである。今回作成した遺伝的地図は、*Da*座位を除けば全てDNA多型を利用している。従って、使用したHNI系統と*Da*変異体間のDNA多型の程度が大きい程、効率良くマーカールをマップすることが可能となる。今回調べたSTSマーカール(表1-3)と既知遺伝子(表1-5)は全てPCR法を利用して増幅された92 bp~780 bpのDNA断片であったが、これらのマーカール全てにおいてDNA多型が確認された為(図1-7)、マップすることが可能となった。このことから、PCR法で容易に増幅することが可能なサイズ(~1 kb)のDNAにおいても、2系統間のDNA多型が十分存在しうることが示唆された。Hughes *et al.* (1997)は、マウスとラット間のイントロンにおける1塩基あたりの塩基置換の頻度は0.201と報告している。これらの2種は3500±1700 万年前に分岐したと考えられている(Janke *et al.* 1994)。メダカの塩基置換突然変異率がげっ歯類のそれと同じであると想定した場合、遺伝的に離れている北方系と南方系は約1.5~2 万年前に分かれたと考えられていることから(Sakaizumi *et al.* 1983)、非コード領域の両系統間の塩基置換の頻度は、0.006~0.022 であることが期待される。しかし、本研究において、平均34 bpに1個(これは1塩基あたり0.029に相当する;表1-4)という期待値よりもやや高い塩基置換が非コード領域において確認された。これは、メダカの塩基置換突然変異率がげっ歯類と異なる、もしくは、メダカの2系統はこれまでに考えられていたよりも以前に分岐していた可能性などで説明されうる。塩基置換に加え、挿入/欠失まで含めた場合、非コード領域の多型の程度は平均31 bpに1個(これは1塩基あたり0.032に相当する 表1-4)であった。この多型性の程度がメダカゲノムの非コード領域における平均値であると仮定すると、PCR法で容易に増幅可能な212 bpのDNA断片には、



99.9%の確率で少なくとも1個の多型が存在することが期待される。本研究で調べたイントロンとSTSマーカーの平均サイズはそれぞれ263 bpと483 bpであったが、これは2系統間の多型を同定するのに十分な大きさであると考えられる。

ゲノムの遺伝的距離は、性染色体をホモに持つ性がヘテロに持つ性よりも長い (Haldane 1922) ことがヒト (Donis-Keller *et al.* 1987)、マウス (Davisson and Roderick 1981)、ショウジョウバエ (Morgan 1914) を含めた様々な生物種で知られている。メダカでは雌がXXのホモ、雄がXYのヘテロの性染色体を保有する為 (Aida 1921)、雌の遺伝的距離が雄よりも長いことが期待された。Wada *et al.* (1995) が作成した雄の組換えに基づく地図と、今回作成した雌の組換えに基づく地図とを比較すると、図1-9からも明らかなように、多くの領域で雄よりも雌の遺伝的距離の方が長く、メダカにおいてもその仮定が当てはまることが示唆された。

Hulbert *et al.* (1988) の関係式を利用して計算した結果、メダカゲノムの遺伝的距離は1776 cMと推測された。この値は、ニジマス (2628 cM; Young *et al.* 1998) やゼブラフィッシュ (2350 cM; Knapik *et al.* 1998) の約2/3である。ニジマスでは、強い干渉によって、1染色体腕あたり1回の組換えしか起こらないことが知られているが、これをもとに考えると、ニジマスの遺伝的距離は2600 cM ( $50 \text{ cM} \times 52$  染色体腕) と計算される。これは遺伝的連鎖地図から推測された値 (2628 cM) と大変近いものである。ゼブラフィッシュゲノムの遺伝的距離は2350 cMで、ハプロイド染色体腕数は50である (Daga *et al.* 1996) ことから、1染色体腕あたりの平均遺伝的距離は47 cMである (Johnson *et al.* 1996により、幾つかの染色体腕の遺伝的距離は100 cM以上あることが知られているが)。強い干渉は、メダカにおいても報告されている (Naruse and Shima 1989)。メダカハプロイド染色体腕数は34であることから (Uwa and Ojima 1981)、1本の染色体腕あたり平均1回の組換えが起こると仮定すると、メダカゲノムの遺伝的距離は1700 cM ( $50 \text{ cM} \times 34$  染色体腕) と推測され、これは連鎖地図に使用したマーカーから推測された値 (1776 cM) と非常に近いものであった。雄の組換えをもとに作成された既存の地図 (Wada *et al.* 1995) では、メダカゲノムの遺伝的距離は2480 cMと推測され、我々の推測より大きな値となっている。この矛盾は性や使用したメダカ系統により生じた可能性も考えられるが、67個のunlinkのマーカーを含めて遺伝的距離を計算したことが大きな原因であるだろう。既存の地図作成に用いられたマーカーの約50%がわずか20個体のタイピングしか行っていないが、この解像度の場合、LOD値が3では11 cM以内にリンクしない



と連鎖が確認されない。遺伝的距離の推測の際に、これらのunlinkマーカーを、11 cMより大きな値で加算した可能性が考えられる。

*Da*変異体の背腹に関する表現型は、主に胴部と尾部で観察される (Ishikawa 1990; Tamiya *et al.* 1997)。本研究では、*wnt5/5b*, *wnt8like*, *shh*, *T*, *pax6* や *pax3* など、尾部形成や、神経管、体節の背腹パターンニングに関わっていると考えられる幾つかの遺伝子をマッピングした。しかしながら、これらの遺伝子の全てが*Da*遺伝子座位にはマップされなかった (図1-9)。このことは、これらの遺伝子が*Da*遺伝子の原因遺伝子ではないことを示している。この方法は位置的候補遺伝子アプローチ法と呼ばれ、ヒトのマルファン症候群 (Dietz *et al.* 1991) や、ゼブラフィッシュの*floating head* 変異体 (Talbot *et al.* 1995) の原因遺伝子単離等において使用され、成功をおさめている。メダカでは*Da*変異体の他にも*pectral finless (pl)* 変異体 (Tomita 1993) や*fused* 変異体 (Takeuchi 1966) などの形態形成に関する変異体が単離されているが、今回マップしたような様々な形態形成遺伝子を多くマップすることは、これらの変異体の原因遺伝子を同定する上での有力な情報源になるものとする。

近年、ヒトと魚類間で進化的に保存された染色体領域が存在することが報告されている (Postlethwait *et al.* 1998; Koop and Nadeau 1996)。メダカにおいても、*LMP2*と*LMP7*の両方の遺伝子がヒトの相同領域にマップされた (Namikawa-Yamada *et al.* 1997)。本研究において、新たに4箇所の進化的に保存された染色体領域を同定した [*shh* (図1-8) と*eng2*, ヒトとゼブラフィッシュ; *asha*と*wnt5*, ゼブラフィッシュ; *T*と*LMP2*, ヒト; *fgf3*と*pax6*, ヒト; 表1-5]。これらの中で、*shh*と*eng2*については*Da*遺伝子の単離に向けて重要な情報をもたらす可能性が考えられる (図1-10)。これらの遺伝子は*Da*遺伝子から2.6 cM (1.4 - 4.4 cM) 及び、1170 kb (630 - 1980 kb) という非常に近接した位置にマップされた (図1-11)。このことから、*Da*遺伝子のオーソログがヒトやゼブラフィッシュにおいて*shh*や*eng2*と同じ染色体上に連鎖している可能性が示唆される。フグでは、平均2 Mbの領域がヒトとフグ間で保存されていることが推測されている (Koop and Nadeau 1996)。魚類間では、さらに長い領域が保存されていると考えられ、実際に本研究において同定されたゼブラフィッシュとメダカ間で保存された領域の中で*asha*と*wnt5*は、21.0 cMもしくは約10 Mbにわたっている。従って、*Da*遺伝子の存在する領域が、ゼブラフィッシュのLG7 (*shh*と*eng2*がマップされているリンケージグループ



ープ)の相同領域である可能性が高い。ゼブラフィッシュのLG7には、*vn-cad*, *tbx6*, *zashb*や*fgf3*などの形態形成に関与する幾つかの遺伝子がマップされている (Postlethwait *et al.* 1998)。その中で*zashb*と*fgf3*については、メダカのオーソログは*Da*遺伝子 (LG VIII) とは異なる連鎖群にマップされた (*fgf3*: LG XII, *ashb*: unlinked)。 *vn-cad*と*tbx6*については、今回設定したdegenerate primerではメダカゲノムからシングルバンドとして増幅されなかった (スミアになってしまった) 為、マップすることが出来なかった。これらの遺伝子は腹側で発現していることから [*vn-cad* (Franklin and Sargent 1996) は神経管の腹側 (20-somite stage) で、*tbx6* (Hug *et al.* 1997) は腹側の内中胚葉 (shield stage) で発現する]、*Da*遺伝子の候補遺伝子となる可能性が示唆された。*Da*変異体では神経冠由来の細胞の極在に異常が見られるが、これは、神経冠細胞が正常に移動しなかった結果である可能性が考えられる。細胞の移動には、カドヘリンを含む細胞接着因子が重要な役割を果たしていることは明らかであることから、腹側の神経管で発現するカドヘリンである*vn-cad*は候補遺伝子の一つとして考えうる。また、*tbx6*については、そのパラログとして考えられている (Postlethwait personal communication) *spadetail* (*spt: tbx16*) (Griffin *et al.* 1998; Ruvinsky *et al.* 1998) の下流には*paraxial protocadherin* (*papc*) があることから (Yamamoto *et al.* 1998)、*tbx6*の可能性も捨てられない。(第三部で得られたBACクローンをテンプレートとしてPCR法を行った結果、これらの遺伝子の増幅産物は得られなかったため、現時点では異なる遺伝子であると考えている。)

*Da*遺伝子とその両側に位置する最も近傍のマーカーであるstsM02-5とstsB07-3との距離は、それぞれ0.32 cM (144 kb), 0.80 cM (360 kb) と推測された (図1-11)。*Da*遺伝子近傍の連鎖地図の解像度は0.16 cM (-0.89 cM; 95%信頼区間) であり、これは72 kb (-400 kb) に1組換え体が存在する計算になる。しかし、遺伝的距離と物理的距離との関係は染色体領域によって様々であることから、この推測が実際の距離とかけ離れている可能性が考えられる。特にセントロメア近傍の領域では組換えが抑制されることが一般的に知られている。LG VIII上のセントロメアはマップされていないが、*Da*遺伝子とセントロメアとの遺伝的距離は40 cMと報告されており (Naruse *et al.* 1988)、*Da*遺伝子はセントロメアから離れた位置に存在しているようである。stsM02-5とstsB07-3の間には現時点までに7個体の組換え体が得られている。これらの個体は、染色体歩行時の方向の決定や、*Da*遺伝子を含む最小



領域を決定する際に利用できる（第三部参照）。BACやPACベクターのインサートサイズの上限が>300 kbであることを考慮すると (Shizuya *et al.* 1992; Ioannou *et al.* 1994)、今回得られたstsM02-5とstsB07-3のマーカは染色体歩行を開始するスタート地点として十分近い位置にあると考えた。



## 第二部：整列化コスミドライブライブラリーの作成



## 緒言

変異体の原因遺伝子をポジショナルクローニングの手法を用いて単離するには、原因遺伝子座位の同定、その領域のゲノムDNAのクローン化、目的の遺伝子の探索、同定、という3つのステップを順次行うことになる(図1-2)。最初のステップでは、連鎖解析を用いて原因遺伝子座位を同定し、目的の遺伝子の近傍に存在するマーカーを得る。次のゲノムDNAのクローン化ステップでは、そのマーカーを利用してゲノムライブラリーのスクリーニングを行い、目的の遺伝子を含むゲノムDNAを単離する。一回のスクリーニングで目的の遺伝子に達していない場合には、遺伝子に到達するまで染色体歩行を行うことになる。従って、ポジショナルクローニングを実行する上で、ゲノムライブラリーを利用することは必須である。よって、使用した生物種でゲノムライブラリーが作成されていない場合には、ライブラリーの作成から行わなければならない。

現在、ゲノムライブラリー作成に使用可能な様々なベクターが開発されている。クローン化できるサイズもベクターによって様々であり、入ファージのような約20 kbのものから、YAC (yeast artificial chromosome) (Burke *et al.* 1987) のように最大2 MbものDNA断片をクローン化可能なものまである。また、各々のベクターに、長所、短所が存在する。ポジショナルクローニングを行う際に用いるベクターは、取り扱いが容易であり、できるだけ長い断片をクローン化できるものが望ましい。YACベクターは、クローン化できるDNA長が現在使用されているベクターのなかで最大である。しかし、酵母を宿主として用いるため扱いが難しい、かなりの割合でキメラクローンが存在する(50%にまで及ぶこともある)、組換え体が不安定で挿入DNA内部に欠失を生じやすい、宿主DNAとYAC DNAを純粋に分離することが難しい、等の大きな問題点がある(Kouprina *et al.* 1994; Monaco and Larin 1994; Larionov *et al.* 1994)。BAC (bacterial artificial chromosome) (Shizuya *et al.* 1992)、PAC (P1-derived artificial chromosome) (Ioannou *et al.* 1994) は大腸菌の単一コピープラスミドであるF因子を利用したクローニングシステムである。300 kb以上のDNA断片もクローン化が可能であり、大腸菌を宿主として用いるため取り扱いも容易である。また、挿入されたDNA断片は100世代以上にわたって安定に保持される(Woo *et al.* 1994)。これらのことからBACやPACベクターは、ゲノ



ムの物理的地図の作成や染色体歩行において現時点で最も適したベクターシステムであると考えられる。しかし、大腸菌1個あたりのコピー数が少ないために大量のクローンの調製が困難である、インサートのサイズがある種の分析には大きすぎる(制限酵素で切断した場合に生じる断片数が多すぎるなど)ため解析が困難である、等の欠点もある。また、巨大なDNA断片を扱うため作成が容易ではない。

コスミドベクターは、従来のプラスミドクローニングベクターにバクテリオファージ入のcos配列を導入し、入ファージの*in vitro*パッケージングの手法を用いて比較的大きなDNA断片(30~45 kb)を効率良く形質転換することが可能なベクターである(Collins and Hohn 1978)。歴史的には古く、YACクローンを扱いやすい大きさにサブクローニングする際に使用されることが多かった。BAC、PACと比較すると、インサートサイズが小さいという欠点もあるが、これは解析が容易であるという点においては長所となる。コスミドサイズの場合、制限酵素地図を作成しやすく、遺伝子の全長を含む可能性も高い。従って、BAC、PACクローンの欠失変異としての解析に利用できる。ライブラリーの作成は比較的容易である。インサートDNAは、キメラや欠失も少なく安定に保持される。また、大量のDNAを調製できるという点でも優れたベクター系である。さらに、実際に幾つかのゲノムマッピング(大腸菌; Kohara *et al.* 1987、線虫; Coulson *et al.* 1988)はコスミドクローンを主体に作成された物理地図をもとに行われたという実績もある。哺乳類ゲノムにおいてもコスミド歩行として利用されることも多い(Niikawa 1996)。

ポジショナルクローニングの2番目のステップとして染色体歩行を行う際には、次々にライブラリーのスクリーニングを行い、目的の領域の物理的地図を作成することになる。近年、複雑なゲノム領域の物理的地図を効率良く作成するために、ゲノムライブラリーをマイクロタイタープレート上で格子上に整列化する(gridする)手法が多く使われるようになってきた。具体的には、形質転換した大腸菌や酵母の一つ一つのコロニーを、96穴、もしくは384穴のマイクロタイタープレートの各ウェルに移植し、大量のプレートとして保存する方法である。その結果、各クローンを数値化して表して管理することができ、ライブラリーを半永久的に保存、使用することが可能となった。また、プレート中のコロニーをウェルの配置通りにメンブレン上に移し取り、高密度フィルターを作成することにより、ハイブリダイゼーションによる陽性クローンの同定、単離が容易になった。さらに重要なことは、多くの研究室が同じライブラリーを同時に平行して使用できるようになったことである。



この場合、多数のライブラリーの利用者から得られたデータを集中させ、統合することが可能となる（参照ライブラリー；Nizetic *et al.* 1991; Nizetic *et al.* 1994）。

染色体歩行時には、できるだけ迅速に効率良くライブラリーをスクリーニングできることが望ましい。ゲノムライブラリーをスクリーニングする際に、多くの場合はハイブリダイゼーション法を用いることが多い。しかし、ハイブリダイゼーション法の場合、プローブ作成やラベリング、ハイブリダイゼーションなどに多くの時間と手間を必要とする。また、プローブが繰返し配列を含んでいた場合、結果に混乱を招き、染色体歩行がそこで止まってしまう恐れもある。近年、整列化ライブラリーの各プレートに3次元に並び換え、各々の軸に対応するDNA溶液を調製し、それをテンプレートとしてPCR法を用いたスクリーニング法が使用されるようになってきた（Chumakov *et al.* 1992; Shepherd *et al.* 1994; Kim *et al.* 1996; Asakawa *et al.* 1997）。その結果、目的のクローンを単離するまでの時間は大幅に短縮され、増幅領域に繰返し配列が含まれている場合でも、PCR法で単一のバンドが増幅されるprimer setを設定することによりスクリーニングが可能となった。

本研究では、メダカ背腹構造突然変異体*Da*の原因遺伝子をポジショナルクローニングの手法を用いて単離することを目的としている。第一部において、メダカ遺伝的連鎖地図を作成して*Da*遺伝子のマッピングを行い、*Da*遺伝子近傍に存在する2個のマーカ－を得ることに成功した(図1-11)。これらのマーカ－は、*Da*遺伝子から各々物理的に144 kbと360 kbの距離に位置することが示唆されたため、染色体歩行の開始点となりうると考えられた。しかしながら、これまでにメダカにおいては染色体歩行に使用しうる大きなインサートを含んだゲノムライブラリーは作成されていなかった。*Da*遺伝子とマーカ－間の推定された距離が正しい場合、インサートサイズが約40 kbであるコスミドライブラリーを使用しても十分染色体歩行を行うことが可能であると考えられた。そこで今回、簡単に作成可能であり、取り扱いや解析が容易に行えるコスミドライブラリーを作成した。また、迅速で効率的にスクリーニングが行えるように、作成したライブラリーをマイクロタイタープレート上に整列化し、PCR法でスクリーニング可能な系を確立した。



## 材料及び方法

### 1. 高分子ゲノムDNAの抽出

コスミドベクターは、約40 kbのインサートDNAをクローニング可能である。制限酵素処理したものをクローニングするわけであるが、40 kbのDNAをクローニングするためには制限酵素処理前のDNA長が150 kb以上であることが望ましい。また、小さいDNA断片はクローニングの効率を著しく下げる恐れがあるため、できる限りインタクトな状態のDNAを抽出する必要がある。通常の抽出の方法ではDNAは50 kb程に壊れてしまうことがしばしばある。従って、DNAを物理的に断片化してしまう恐れのある激しい攪拌を避け、フェノール処理、エタノール沈澱などを行わない以下の方法でゲノムDNAの抽出を行った。

4匹のHNI系統（雄雌両方含む；図1-1A）をDWで洗浄し、カッター刃で内臓、眼球、鰭を除いた。残りの必要な部分を液体窒素で凍らせ、乳棒で粉末状になるまで砕いた。10 mlの抽出buffer (10 mM Tris-HCl/0.1 M EDTA) に、HNIの粉末を冷やしたスパテルで少しずつ溶かしながら加えた。終濃度が0.5%となるようにSDSを加え、スパテルで穏やかに混合した。終濃度が20  $\mu\text{g/ml}$ となるようにRNaseA (GIBCO) を加え、同様にスパテルで攪拌し、37°C、1 hr インキュベートした。終濃度が100  $\mu\text{g/ml}$ となるようにProteinaseKを加え、50°C、24 hr インキュベートした。サンプルを15°Cに冷却し、3000 rpm、10 min 遠心後、上清のみを等量の2×変性buffer (80%ホルムアミド/0.8 M NaCl/20 mM Tris-HCl pH8.0) に加え、上下反転しながら混合し、15°C、16 hr 以上 インキュベートした。サンプルをデカンテーションで透析チューブに移し、3 lの透析液A (20 mM Tris-HCl pH8.0/10 mM EDTA pH8.0/0.1 M NaCl) 中で4°C、16 hr 透析を行った。透析液Aでさらに2回透析後、透析液B (10 mM Tris-HCl pH8.0/10 mM EDTA pH8.0/0.1 M NaCl) で6回透析した。サンプルの入った透析膜をタッパーに移し、PEG20000 (Wako) で透析膜を覆い、1 hr 放置し、サンプル液量を減らした。サンプルはデカンテーションでエッペンチューブに移し、DNAの濃度測定を行った。0.3%アガロースゲルを用いた通常の泳動と、パルスフィールドゲル電気泳動を行うことにより、回収したゲノムDNAの大きさを調べた。パルスフィールドゲル電気泳動はBioRad DR IIを用い、1%



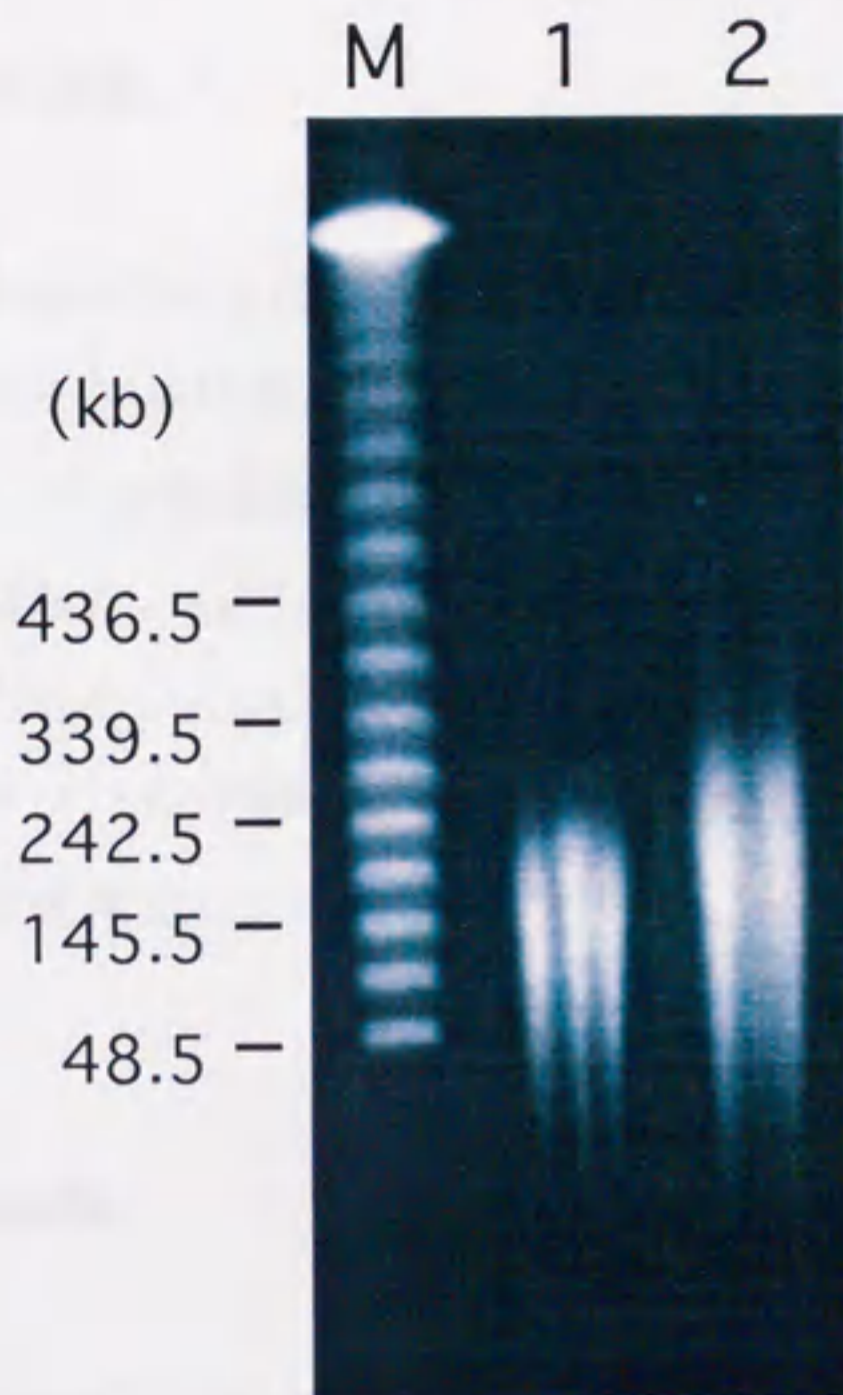


図2-1 抽出したゲノムDNAのパルスフィールド  
ゲル電気泳動

1: 通常の手法（フェノール処理、エタノール沈澱を行う）で抽出したHNIゲノムDNA。2: フェノール処理、エタノール沈澱など、DNAを物理的に切断してしまう恐れのある操作を行わないで抽出したHNIゲノムDNA。DNA長の上限は明らかに2の方が大きい。また、染色されたDNAの平均長は1が約150 kb、2が約200 kbであった。M: サイズマーカー



アガロースゲル (含EtBr), 6V/cm (132 V), パルスタイム60-120 sec, 16 °C, 40 hrの条件で行った (図2-1)。

## 2. コスミドベクターの調製

ベクターには、SuperCos1 (STRATAGENE) を用いた。手順の大部分はキットに添付されてくるプロトコルに基づいて行った。環状のSuperCos1ベクターDNAを*Xba* Iで切断、フェーノール処理後、エタノール沈澱を行い、ゲルで泳動して完全に切れていることを確認した。calf intestinal alkaline phosphatase (CIAP) (NEB) 処理を行い、脱リン酸化した。CIAP処理は2回行った。次に、*Bam* HIで切断後、フェーノール処理後、エタノール沈澱を行い、DWに溶かした。spot checkとゲル電気泳動にてベクターの濃度を測定し、ligationに用いた。

## 3. インサートDNAの調製

まず、*Sau*3AI (NEB) でのゲノムDNAの部分分解の予備実験を行い、目的の大きさ (40 kb) に切断されてくるDNA量が多くなるような条件を決定した。制限酵素による部分分解は、微妙な条件の違いで異なってくるため、再現性を得ることは難しい。従って、できる限り再現性が得られるように、温度が正確なインキュベーター (TAIYO INCUBATOR M-100<sup>N</sup>; TAITEC) を用い、制限酵素やbufferは同じロットのものを毎回使用した。また、DNAの物理的な切断を避けるために、チップは先端をカットした物を使用した。DW 781  $\mu$ l, 10 $\times$ buffer 99  $\mu$ l, 100 $\times$ BSA 10  $\mu$ lを1.5 mlチューブ中で混合し、37 °C, 10 min, プレインキュベートした。先端カットチップでHNIゲノムDNA (50 ng/ $\mu$ l) を100  $\mu$ l (5  $\mu$ g) 加え、30回ピペッティングし、さらに、37 °C, 10 min, プレインキュベーションを行った。その間に制限酵素を調製した。DW 346  $\mu$ l, 10 $\times$ buffer 40  $\mu$ l, 100 $\times$ BSA 4  $\mu$ l, *Sau*3AI 10  $\mu$ lを混合 (0.1 U/ $\mu$ l) し、10  $\mu$ lをインキュベート中のサンプルに加え、先端カットチップで20回ピペッティングした。37 °Cでインキュベーションを続け、制限酵素を加えてから、2, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 70, 90 min後に、先端カットチップで



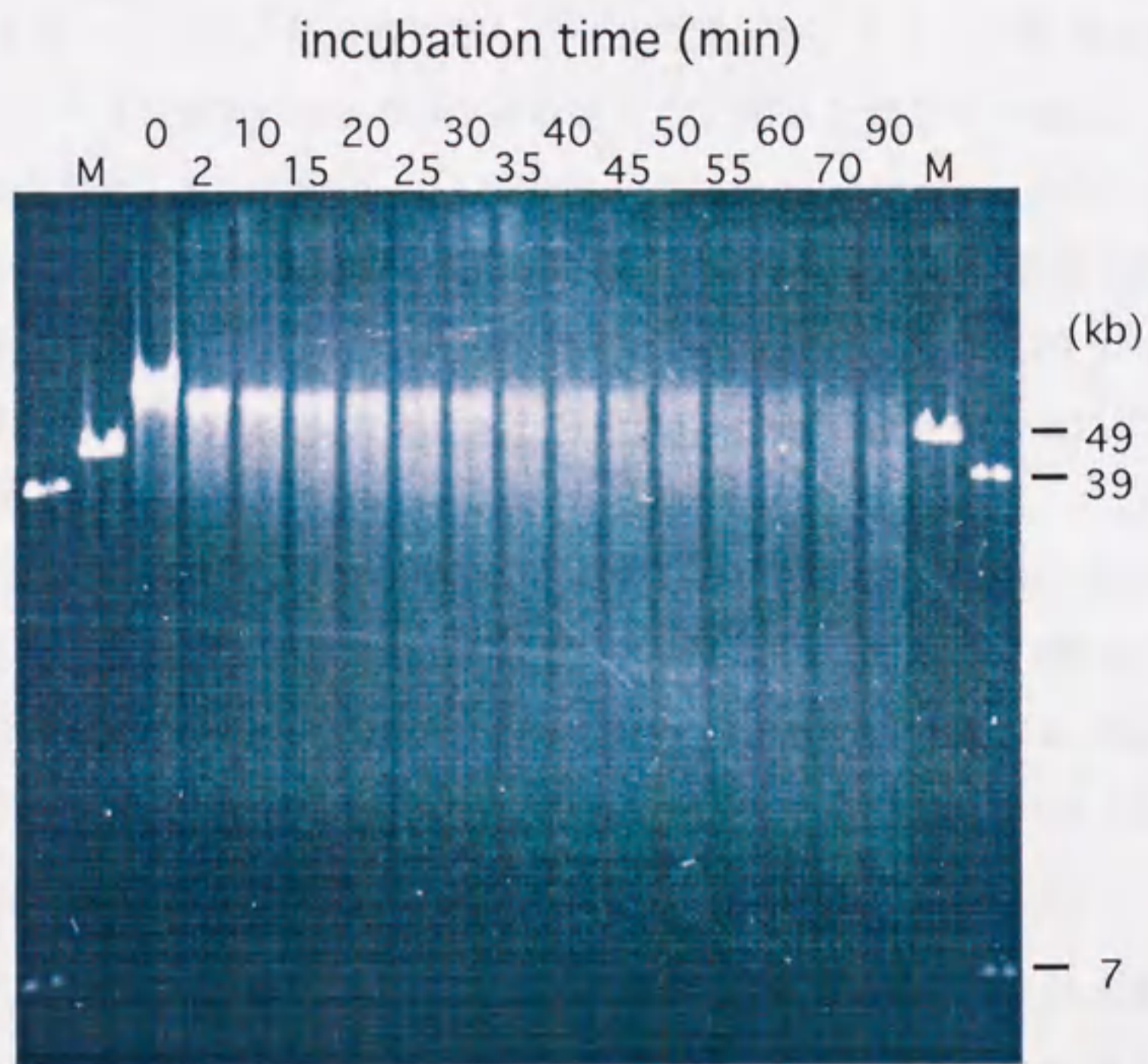
50  $\mu$ lを5  $\mu$ lの0.5M EDTA (予め冷やしておいたもの)に加えて10回ピペッティングし、反応を停止した。65 °Cで5 minインキュベートして制限末端間の結合を解離し、18  $\mu$ lを0.3 %アガロースゲルで泳動した (50 V) (図2-2)。

実際にligationに使用するインサートDNAの部分分解は、上記と全く同じ条件で、インキュベーションの時間を30 minで停止した。反応は同じ条件で2チューブ (DNA量は計10  $\mu$ g) 行い、イソプロパノール沈澱後1本のチューブにまとめた。再度イソプロパノール沈澱を行い、10T0.1E (10 mM Tris-HCl pH8.0 / 0.1 mM EDTA) に溶解し、65 °Cで5 minインキュベート後、0.7 %低融点アガロースゲル(1  $\times$ TAE) で30 V overnightで泳動を行った。ゲルはEtBr (in 1  $\times$ TAE) で染色し、目的の大きさ (35~40 kb) の部分 (サンプル1) とさらに大きな部分(サンプル2) の2箇所を切り出した。次に、Agarase処理によるゲルからのDNAの回収を行った。切り出したゲル量を測定し、その2倍量の1  $\times$   $\beta$  Agarase buffer で2回洗浄 (30 min 氷上) 後、bufferを除き65 °C 10 minインキュベートしてアガロースを溶かした。40 °Cに移し、5 min インキュベートし、1  $\mu$ l (1 Unit) の $\beta$ -Agarase I (NEB) を加え、先端カットチップでピペッティング後、40 °C 1 hr インキュベートした。その後、65 °C 10 min インキュベートして15,000 rpm 10 min 4 °C で遠心した。一部を0.3 %アガロースゲルで泳動し、目的の大きさのものが回収できていることを確認した。上清はウルトラフリーC3 (ミリボア) を用いて10T0.1E (10 mM Tris-HCl pH8.0 / 0.1 mM EDTA) に対してovernightで透析を行った。その間に2~3回TEを交換した。透析後のサンプルはエタノール沈澱を行い、50  $\mu$ lの10T0.1Eに溶かした。5  $\mu$ lは確認用として泳動し、残りのサンプルの脱リン酸化を行った。CIPは5  $\mu$ l (50 Unit) 使用し、100  $\mu$ l量で37 °C 1 hr 反応させた。EDTAを加えて反応を停止後、68 °C 30 min インキュベートした。フェーノール/クロロホルムで2回、クロロホルム/イソアミルアルコールで1回処理し、エタノール沈澱をした。最終的に10  $\mu$ lの10T0.1Eに溶解し、0.5  $\mu$ lのサンプルを20倍希釈してspot checkでDNA濃度を測定した。

#### 4. Ligation, Packaging, Titering

上記のサンプル1のDNAは250 ng、サンプル2のDNAは120 ngを等量の





### 図2-2 HNIゲノムDNAの *Sau3AI*による部分分解

抽出した高分子HNIゲノムDNAの *Sau3AI*による部分分解の条件設定を行った。ゲノムDNAの抽出時にフェノール処理をしていないが、*Sau3AI*切断は阻害されなかった。インキュベーションの時間を長くするに従って、短く切断されていくことが確認される。短い断片はligationを競合的に阻害してしまうため、短い断片が少なく、目的の大きさ（40 kb前後）の断片が多い条件を検索した。実際には、30 minのインキュベーション時間を採用した。



SuperCos1 DNAとligationした。まず、ligase以外を混合し、65 °C, 10 min インキュベートした後、氷上に移し、2 Weiss UのT4 DNA ligaseを加え、4 °C, 18 hr反応させた。反応液量は15  $\mu$ lにした。ligation後のサンプルは-20 °Cで保存した。

packagingにはGigapack III XL (STRATAGENE) を使用した。packaging extractを-80 °Cのフリーザーから取りだし、氷上に置いた。チューブを指の間にはさみ、溶け始めたらすぐにligationサンプルを加えた。加えたサンプル量は、サンプル1、サンプル2共に3  $\mu$ l、コントロール用の $\lambda$ DNAは1  $\mu$ l(0.21  $\mu$ g)とした。泡が立たないようにチップの先端でよく攪拌した後、3~5 sec遠心し、室温で2 hr インキュベートした。SM bufferを500  $\mu$ l( $\lambda$ DNAには1 ml)加え、さらに20  $\mu$ lのクロロホルムを加えて穏やかに混合した。チューブを1000 rpmでspin downしてtiteringに用いた。残りのサンプルは4 °Cで保存した。

titeringを行うにあたり、まず宿主菌を調製した。宿主菌にはXL1-Blue MRを使用した。また、packaging効率のコントロールとして、VCS257を用いた。XL1-Blue MRとVCS257のシングルコロニーを拾い、LB broth (0.2 % maltose/10 mM MgSO<sub>4</sub>)で一晩培養した。2000 rpmで10 min遠心し、菌をspin downし、上清を除いた。10 mM MgSO<sub>4</sub>でOD<sub>600</sub>=0.5に調製し、宿主菌として用いた。

以下の手順でtiteringを行った。packaging産物をSM bufferで10倍希釈し(サンプル2.5  $\mu$ l+ SM buffer 22.5  $\mu$ l)、25  $\mu$ lの宿主菌 (OD<sub>600</sub>=0.5)を加え、室温で30 min インキュベートした。200  $\mu$ lのLB brothを加え、37 °Cで1 hr インキュベートした。このとき、15 minごとにチューブを穏やかに攪拌した。1 min、spin downして、100  $\mu$ l残して上清を除いた。ペレットを攪拌してLB-アンピシリン(50  $\mu$ g/ml)寒天プレートに全量まいた。37 °Cで一晩培養し、コロニー数を測定した。 $\lambda$ DNAを用いた、packaging効率のポジティブコントロールは、キット (Gigapack III XL) のマニュアルに従って行った。

## 5. コスミドライブラリーの整列化

作成したコスミドクローンを384穴マイクロタイタープレートに植え継ぎ、ライブラリーの整列化を行った(図2-3)。まず、packaging直後に形質転換したLB-



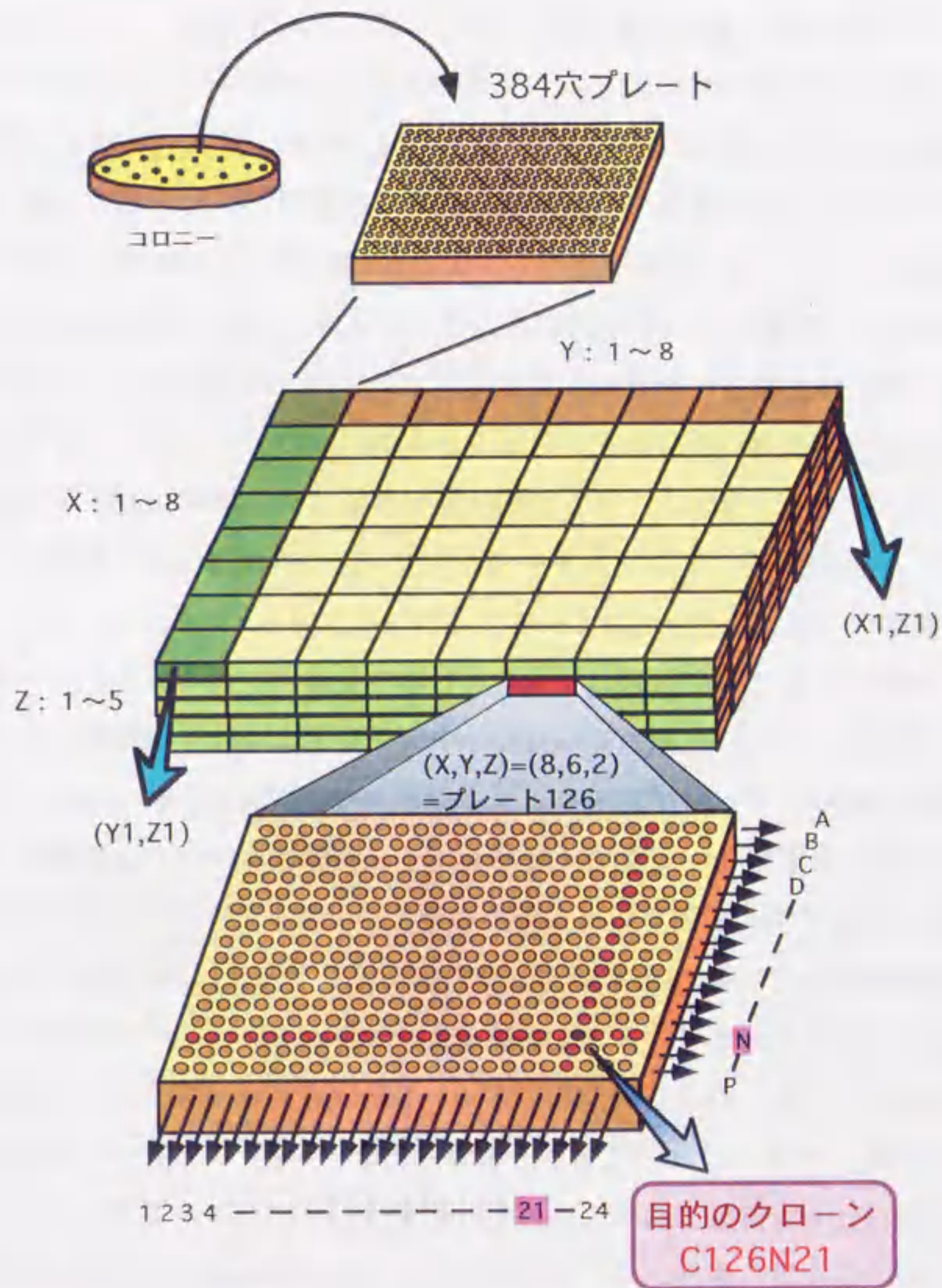


図2-3 コスミドライブラリーの整列化、及びPCR法を用いたスクリーニング系

コスミドクローンを持つ大腸菌のコロニーを、一個一個爪楊枝で拾い、384穴プレートの各ウェルに植え継ぐことによって、384穴プレート320枚(122880クローン)に整列化した。これは、メダカハプロイドゲノムをおよそ6回カバーするものである。プレートは、001~320まで通し番号を付け、それぞれレプリカプレートを2枚ずつ作成した。整列化ライブラリーから、迅速に目的のクローンを単離するために、PCRスクリーニングの系を確立した。320枚のプレートを8(X)×8(Y)×5(Z)の軸に3次元に整列し、各々のZ段についてX軸Y軸の各ブロックのDNA mixtureを調整した。そのDNA mixtureをテンプレートとしてPCRを行うことによって、3回のPCRで目的のクローンを単離することが可能である。PCRスクリーニングについては、図2-5参照。



アンピシリン (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) アガープレート上のコスミドクローン (約200 個/9 cm シャーレ) を、37  $^{\circ}\text{C}$ で一晩培養し、コロニーが出てきたものは植え継ぎ時まで4  $^{\circ}\text{C}$ で保存した (~2 週間)。384穴マイクロタイタープレート (GENETIX) の各ウェルに2YT/7 %グリセロール (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  アンピシリン) を50  $\mu\text{l}$ ずつ分注し、使用するまで-20  $^{\circ}\text{C}$ で凍結した。使用時に解凍し、蓋の裏側についた水滴をキムワイプで拭き、アガープレート上のコロニーを1個1個つまようじ拾って各々のウェルに植え継いだ。1個のウェルに1個のクローンとなるように独立したコロニーを拾い、できる限りコンタミネーションを避けた。同じウェルに異なるコロニーを植え継いでしまったものについては、プレートとウェルの番号を記述しておいた。植え継いだプレートは、37  $^{\circ}\text{C}$ で16~20 hr培養した。菌の増殖が確認されたものは、-80  $^{\circ}\text{C}$ のディープフリーザーで保存した。最終的に384穴マイクロタイタープレート320枚 (122880コロニー) にコロニーを植え継いだ。プレートには001~320までの通し番号をつけ、プレートと蓋の両方の側面に番号を書いた。各プレートは、2枚ずつレプリカを作成した。凍結しておいたオリジナルのプレートを解凍し、コンタミネーションを避けるために、蓋の裏側についた水滴をキムワイプで拭いた。同様に培養液の入った植え継ぎ用のプレートも解凍した。オリジナルプレートが完全に解凍した直後に、384穴マイクロタイタープレート用のプラスチック製の剣山を使用して同時に2枚のプレートに植え継いだ。オリジナルプレートはすぐに-80  $^{\circ}\text{C}$ で凍結保存し、レプリカプレートは37  $^{\circ}\text{C}$ で16~20 hr培養した。増殖してこないウェルについては番号を記述した。レプリカプレートも同様に-80  $^{\circ}\text{C}$ で凍結保存した。オリジナルプレート (original) を1、レプリカプレート2枚のうち一方を2 (2nd)、もう一方を3 (working) として、各々のプレート蓋の側面に番号を書いた。通常はworkingプレートをを使用することとし、workingプレートが働かなくなった場合にのみ2ndプレートから新たにworkingプレート用のレプリカを作成することにした。原則的にoriginalプレートは二度と解凍しないことにした。

## 6. PCRスクリーニング用DNA mixtureの調製

320枚のプレートを8(X)  $\times$  8(Y)  $\times$  5(Z)に整列し (図2-3)、3段階のPCR法で目的のクローンが単離できるようなDNA mixtureを調製した。PCRスクリーニング



の手順は次のとおりである。まず、5段あるZのうちどれに目的のクローンが存在するかを調べ(1stスクリーニング)、次に陽性シグナルのあったZ段についてX軸Y軸PCRスクリーニングを行い(2ndスクリーニング)目的のクローンを含むプレートを決める。最後に、そのプレートの縦、横ミゾプレート培養を行い、培養液1  $\mu$ lをテンプレートとしたPCRを行う(3rdスクリーニング)。これらのPCRのテンプレートに用いるDNA mixtureの調製法について以下に示す。

まず、各々のZ段について個別にX軸、Y軸のDNA mixtureの調製を行った。調製するDNA mixtureの数は、各Z段について8(X軸)+8(Y軸)の16 mix、Z段が5段あるので、計80(16  $\times$  5)サンプルである。各々の軸に対応する8枚分の384穴プレートから、100  $\mu$ lの2YT/7%グリセロール(50  $\mu$ g/mlアンピシリン)を各ウェルに分注した1枚の384穴プレート(Nunc)に、剣山を使用して菌を植え継いだ。この時、各ウェルには8種類の独立したコスミドクローンを持つ大腸菌(8クローン分)が存在することになる。37  $^{\circ}$ Cで16~20 hr培養した後、各ウェルから培養液を回収し、一本のチューブにまとめた(3072クローン分:384  $\times$  8)。その後、通常のアリカリミニプレップ法でコスミドDNAを回収した(PCR反応200回分以上に相当:マーカーによっては10000 PCR反応分以上)。RNaseA処理後、PEG沈を行い、最終的に200  $\mu$ lのTE bufferに溶解した。これらのうち1  $\mu$ lをX軸Y軸のPCRスクリーニングの1反応分のテンプレートとして使用した。Z段スクリーニング用のDNA mixtureは、X軸Y軸スクリーニング用のmixの一部を混合することにより調製した。

## 7. コスミドインサートDNAサイズの決定

コスミドDNAは、通常のアリカリミニプレップ法で回収した。回収したDNAのうち約100 ngを*Not* Iまたは*Eco* RIで切断した。*Not* I切断したものは0.3%、*Eco* RI切断したものは0.3%と0.8%アガロースゲルで泳動し、EtBr染色した。同時に泳動したサイズマーカーとの比較により、サイズを決定した。*Not* I切断したものと、*Eco* RI切断したものとで矛盾がないことを確認した(図2-4)。

## 8. コスミド末端シーケンシング



回収したコスミドDNA約2  $\mu\text{g}$ を*Not* Iで切断し、フェノール/クロロホルム処理を2回、クロロホルム/イソアミルアルコール処理を1回を行い、エタノール沈澱した。ペレットは10  $\mu\text{l}$ の10T0.1E (10 mM Tris-HCl pH8.0 / 0.1 mM EDTA) に溶解した。電気泳動とspot checkで濃度測定を行い、シーケンス反応のテンプレートとして用いた。1シーケンス反応に、200 ng ~ 600 ngのテンプレートを使用した。シーケンス用のprimerとして、sCosF (GCCGCAATTAACCCTCAC) と、sCosR (GGCCGCATAATACGACTCAC) を設定した。シーケンスキットはABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) を使用し、20  $\mu\text{l}$ のスケールで、96 °C, 5 minのdenature後、96 °C, 30 sec, 50 °C, 15 sec, 60 °C, 4 minを25 cycles反応させた。反応産物はイソプロパノール沈澱を行い、80 %エタノールでリンス後、20  $\mu\text{l}$ のTSRに溶かした。96 °Cで2 min、denatureし、Applied Biosystems Model 310 DNA sequencerで泳動し、解析を行った。

## 9. コスミド歩行

染色体歩行とは、目的の遺伝子近傍のマーカークをプローブとしてゲノムライブラリーのスクリーニングを行い、得られたクローンのコンティグの末端部分をプローブとしてさらにスクリーニングし、目的の遺伝子に到達するまでこれを繰り返す(歩行する)ことを言う。ゲノムライブラリーとしてコスミドライブラリーを用いた場合に、これをコスミド歩行と呼ぶ。

整列化したコスミドライブラリーを使用して、stsM02-5から数回のコスミド歩行を行った。ライブラリーはPCRスクリーニングが可能のため、スクリーニングにはPCR法を用いた。stsM02-5のマーカークでPCRスクリーニングを行い、単離されたクローンの末端塩基配列を決定した。コスミドクローンは、*Not* I、*Bam* HI、*Bgl* Iの制限酵素を組み合わせで切断、泳動を行い、制限酵素地図を作成した。末端配列をもとに新たにSTSマーカークを設定し、整列化コスミドライブラリーのPCRスクリーニングを再度行った。これを2回程繰り返した。



## 結果

### 1. コスミドライブラリーの作成

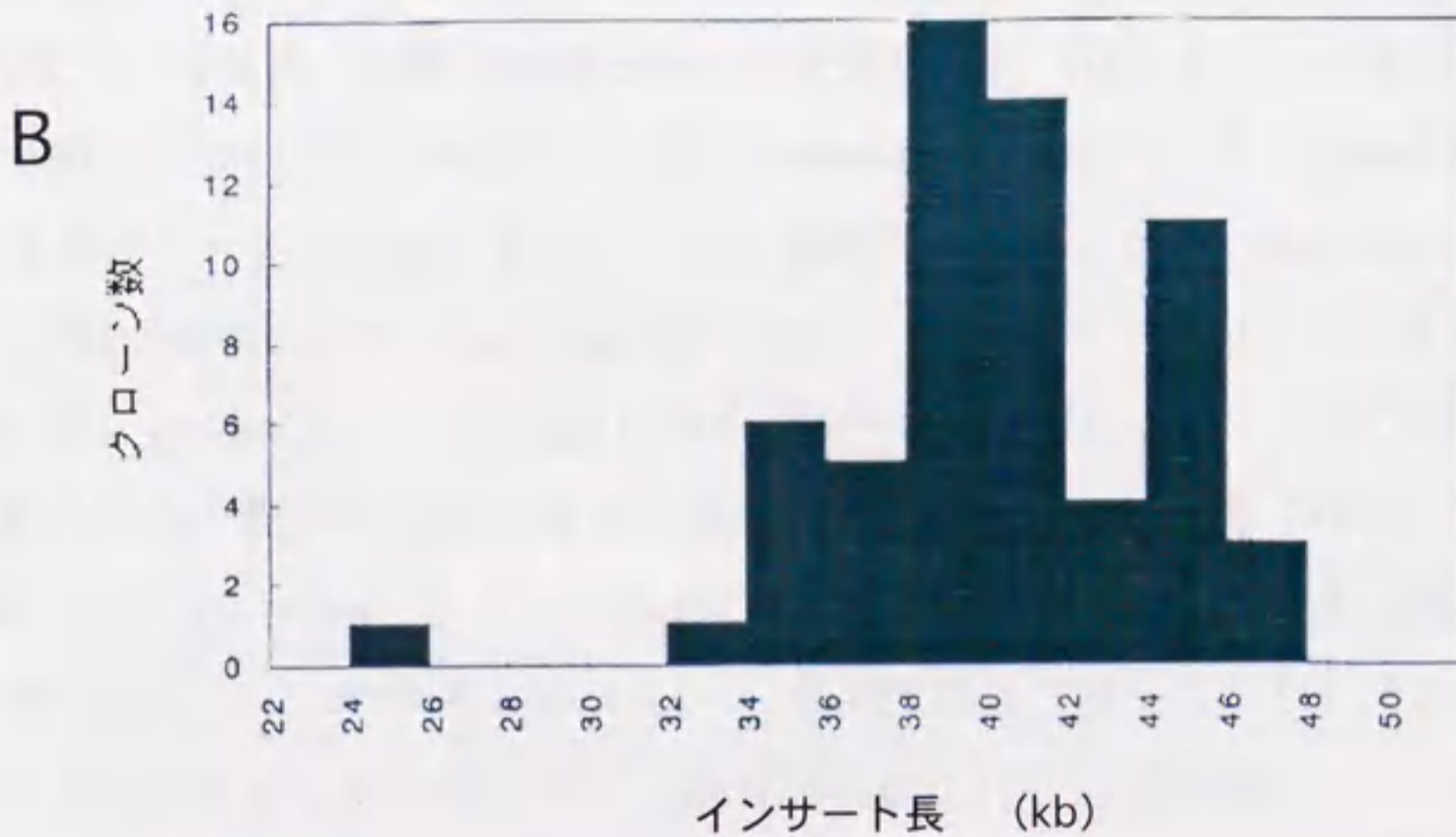
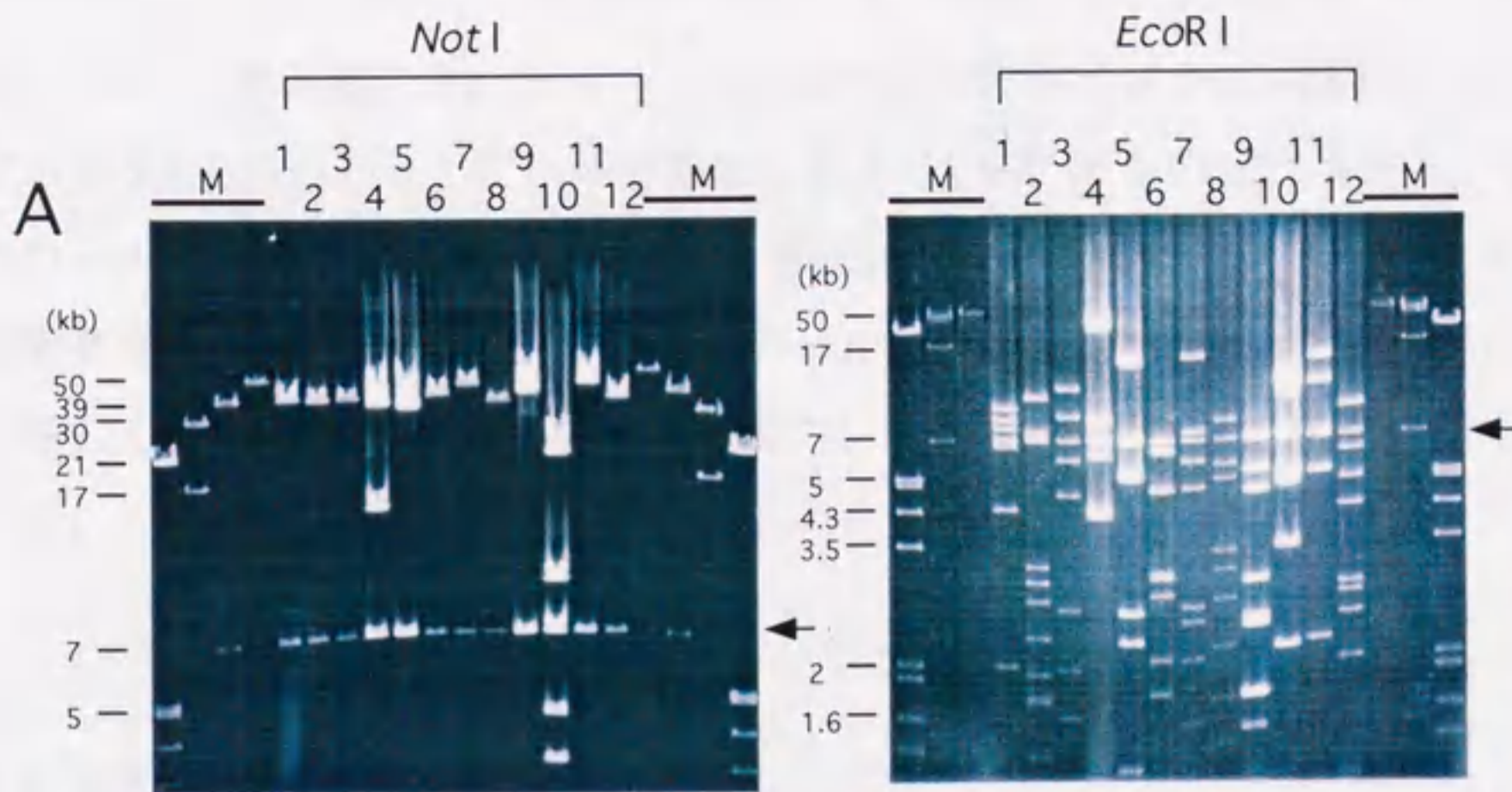
巨大DNA断片を含むゲノムライブラリーを作成するためには、インサートサイズ以上に大きなDNAを回収しなくてはならない（コスミドの場合は150 kb以上であることが望ましい）。今回、DNAを物理的に切断する恐れのあるフェノール処理やエタノール沈澱を行わない方法でゲノムDNAを抽出した。その結果、～320 kbのDNAを回収することができた（図2-1）。これは、フェノール処理、エタノール沈澱を行って回収したDNAより若干大きいものであった。フェノール処理を行っていないため、DNA溶液に不純物が残っている可能性があったが、これは、DNAを分解してしまうものでもなく、また、*Sau3A1*制限酵素処理を阻害するものでもなかった（図2-2）。

*Sau3A1*切断後、ゲル切出しによるサイズ分画を行ったDNAに対してベクターとligationし、packagingした。切出しは、目的の大きさ（35～40 kb）の部分（サンプル1）とさらに大きな部分（サンプル2）の2箇所について行った。titeringの結果、効率は各々、サンプル1： $1.2 \times 10^6$  cfu/ $\mu$ gインサートDNA；サンプル2： $9.1 \times 10^6$  cfu/ $\mu$ gインサートDNAであり、サンプル2の方が高い効率であった。サンプル1は250 ng、サンプル2は120 ngをligationしたので、毎回同じ効率でpackagingされると仮定した場合、計1392000クローン得られることになる（ $1.2 \times 10^6 \times 250 / 1000 + 9.1 \times 10^6 \times 120 / 1000$ ）。61個の独立したクローンを単離し、*Not I*切断、*Eco RI*切断を行いインサートサイズを調べた結果、平均インサートDNAサイズは40.2 kbであった（図2-4）。メダカハプロイドゲノムサイズを800 Mbとした場合、今回作成したコスミドライブラリーはメダカハプロイドゲノムを約70倍カバーしている計算になる（ $1392000 \times 0.0402 / 800$ ）。

### 2. コスミドライブラリーの整列化

コスミドクローンの大腸菌コロニーの一部を384穴マイクロタイタープレート





平均インサート長 ----- 40.2 kb

図2-4 コスミドクロンのインサートDNA長

A: 独立した12個のコスミドクロンのNotI切断(左)と、EcoRI切断(右)泳動像。同じ番号のクローンは同一のクローンである。サイズマーカーとの比較により各断片の大きさを決定し、インサート長を算出した。NotI切断とEcoRI切断とで矛盾がないことを確認した。M:サイズマーカー, 矢印: ベクター由来の断片。B: コスミドクロンのインサートDNA長のヒストグラム。計61クローンを調べた。1個を除いて32~48kb以内に含まれた。平均インサートサイズは40.2kbであった。



の各ウェルに拾い、ライブラリーの整列化を行った(図2-3)。320枚のプレートに計122880クローン植え継いだ。従って、今回整列化したライブラリーはメダカハプロイドゲノムを6.2倍カバーしている計算になる( $122880 \times 0.0402 / 800$ )。植え継いだクローンの99.1%は培養後に増殖してきた。クローンのピックアップはロボットを使用せず人の手で行われたが、1個のウェルに異なる2クローンを植え継いでしまった等のミス割合は1.5%であった。各プレートは2枚ずつレプリカプレートを作成した。

### 3. PCRスクリーニング系の確立

320枚の384穴マイクロタイタープレートを8(X) × 8(Y) × 5(Z)の軸に整列し、各々のZ段についてX軸、Y軸のDNA mixtureを調製した(図2-3)。パイロット実験として、第一部で得られた3個のマーカー(stsM02-5、stsB07-3、*arom*)を用いて実際にPCRスクリーニング法によるクローン単離を試みたところ、stsM02-5は6クローン、stsB07-3は1クローン、*arom*は5クローンのコスミドクローンを単離することに成功した。*arom*については1枚の384穴プレートに2個のクローンが存在しているものもあったが、調べた限りでは全て独立したクローンであった(*arom*: Tanaka personal communication)。大部分において2日で目的のクローンを同定することができたが(図2-5)、2ndスクリーニング(X軸Y軸スクリーニング)でいくつもの陽性クローンが存在していた場合(1個のZ段に数クローンが存在していた場合)に、目的のプレートを同定するために手間を要した。stsM02-5に関しては2回程コスミド歩行を行い、今回作成したライブラリーを用いて染色体歩行が可能であることを示した(図2-6)。第三部で新たに設定したマーカーを含め、計18個のSTSマーカーを用いて1stスクリーニング(Zmixスクリーニング)を行ったが、全てのマーカーで陽性クローンが同定された(表2-1)。これは、今回作成した整列化コスミドライブラリーの質の高さを示すものである。



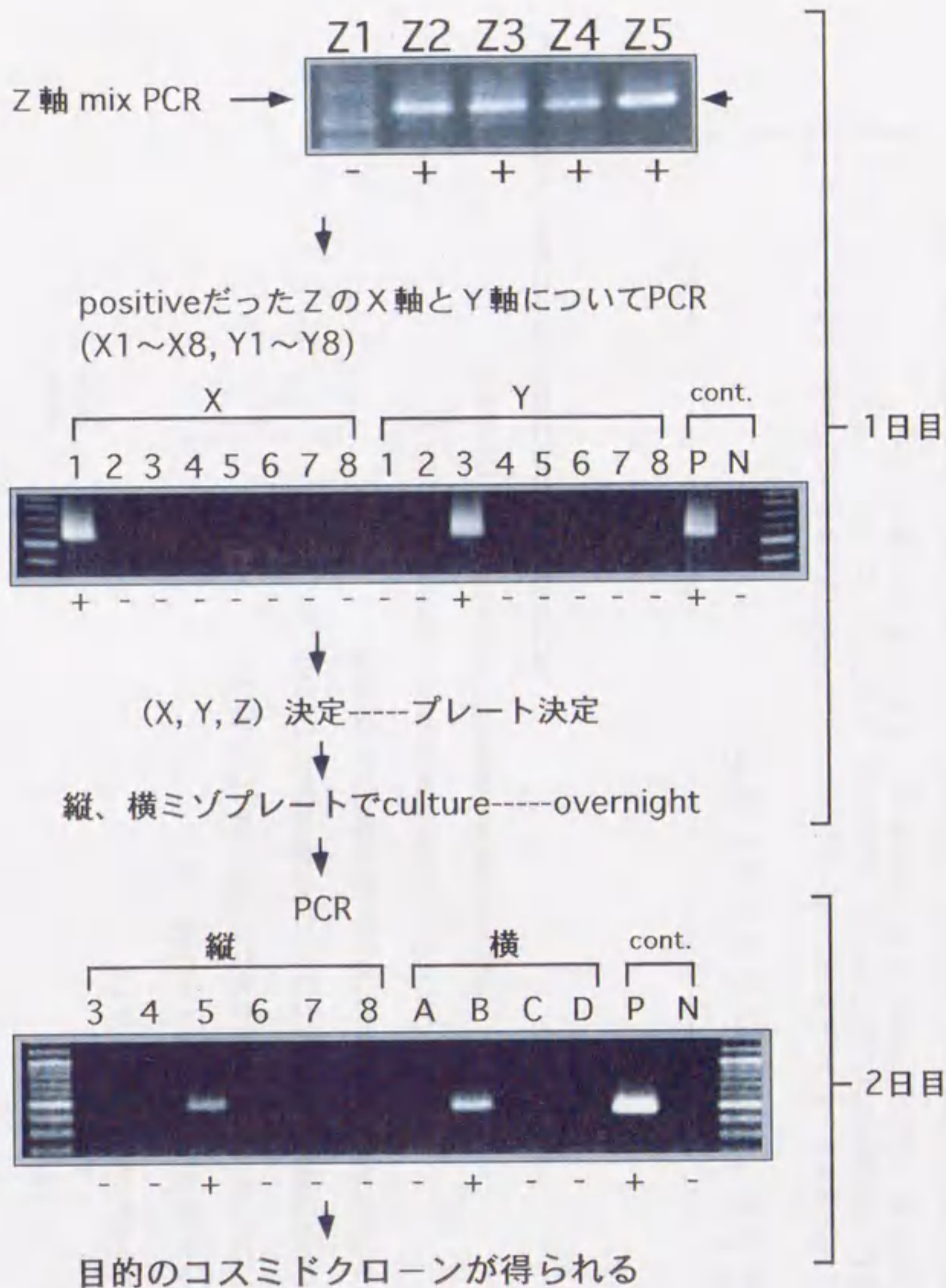


図2-5 コスミドライブラリーのPCRスクリーニング

整列化コスミドライブラリーをPCR法を利用してスクリーニングする系を樹立した。本法では、3回のPCRで目的のクローンを得ることが可能である。まず、図2-3の整列化したプレートの、各々のZ段のDNA mixtureに対してSTSマーカーを利用したPCRを行う。図ではZ2~Z5が陽性である。この段階で、ライブラリー中に目的のクローンがあるか否かが分かる。次に、陽性だったZ段のX軸とY軸のDNAプールに対してPCRを行う。ここで、X, Y, Zの座標が定まり、プレートが決定する。さらに、陽性プレートから目的のクローンを得る為に、もう一度PCRを行う。3回目のPCRのテンプレートは、ウェルの縦軸と横軸に各々溝が彫ってある縦溝、横溝プレートに、陽性プレートからレプリカをとり、一晚培養したものである(図2-3)。従って、クローンの単離に2日を要する。



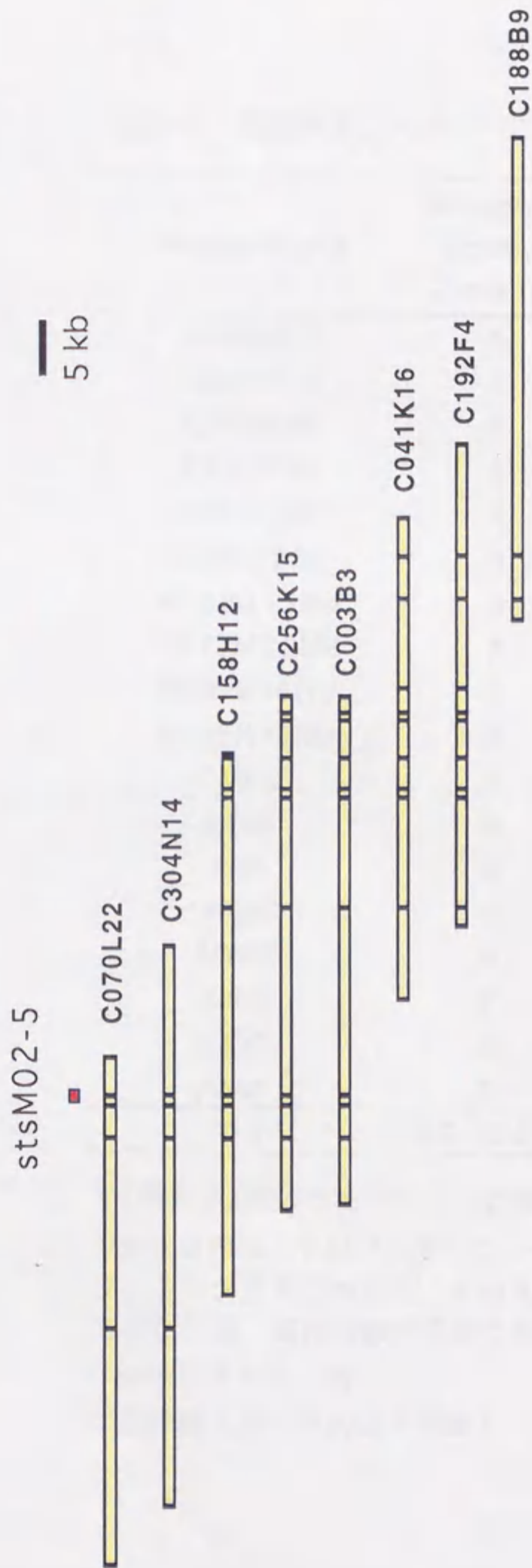


図2-6 stsM02-5マーカーからのコスミド歩行

STSマーカー"stsM02-5"を開始点としてコスミド歩行を行った。スクリーニングはPCR法を用いた。単離したクローンについて制限酵素地図を作成し、末端部分に新たなSTSマーカーを設定した。そのSTSマーカーを用いてさらにPCRスクリーニングして、コスミド歩行を行った。2回の歩行で約130 kbの領域をカバーするコンティングが作成された。



表2-1 Z段PCRスクリーニング

Marker Name	<sup>a</sup> Number of positive Z mixture	<sup>b</sup> (Expected) Number of clones
stsM02-5	5	6
stsB07-3	1	1
C003B3F	5	5
C003B3R	4	5
C041K16R	2	3
C010P20F	3	( $\geq 3$ )
B159G15M4	2	5
B177M22M4	2	5
B187B15RV	3	5
B185K13M4	3	( $\geq 3$ )
<i>LMP2</i>	4	( $\geq 4$ )
<i>arom</i>	4	5
<i>shh</i>	4	( $\geq 6$ )
<i>eng2</i>	3	( $\geq 5$ )
<i>MYH2</i>	5	( $\geq 5$ )
<i>asha</i>	2	( $\geq 2$ )
<i>pax3</i>	3	( $\geq 3$ )
<i>pax6</i>	2	( $\geq 2$ )
<sup>c</sup> 18	<sup>d</sup> 57 (3.2)	

<sup>a</sup>: 5段あるZ段のうちマーカーが増幅されたZ段数

<sup>b</sup>: カッコ内は、1 stスクリーニングまたは2 ndスクリーニングまで行ったが、3 rdスクリーニングはしていない為、実際の数不明であるもの

<sup>c</sup>: 調べたマーカー数

<sup>d</sup>: 合計数 (カッコ内は平均数)



## 考察

染色体歩行を含め、ゲノムの解析を行う際に、ゲノムライブラリーの存在は不可欠である。これまでにメダカでは有用なゲノムライブラリーが作成されていなかった。そこで本研究でコスミドベクターを使用して、平均インサートサイズ40.2 kbのメダカゲノムライブラリーを作成した。ライブラリーは384穴マイクロタイタープレート上に整列化し、X軸Y軸について各ブロックのDNA mixtureを調製（200 PCR反応分以上；マーカーによっては10000 PCR反応分以上）して、迅速にスクリーニングが可能となるPCRスクリーニングの系を確立した。

今回、コスミドベクターを用いた理由とコスミドの利点を以下に示す。1) クローンの取り扱いと解析が容易である。1個の菌あたりのコピー数が10～20個と多く、十分な量のDNAが得られる。2) 第一部で示したように、メダカでは1 cMが約450 kb程度と考えられる。ポジショナルクローニングを目指す場合、1000～2000個体の減数分裂を調べることが理想的であり、メダカではそれが可能である。この場合、遺伝的地図の解像度は0.05～0.1 cMであり、物理的には23～40 kbである。コスミドの平均インサートサイズは40 kbであることから、コスミドクローンのみでポジショナルクローニングを行うことが可能であると考えられる。3) メダカの総遺伝子数を6万個、ハプロイドゲノムサイズを800 Mbとした場合、平均13.3 kbに1個の遺伝子密度となる。従って、1個のコスミドクローンあたり平均3個の遺伝子を含んでいることになる。コスミドクローンは1個の遺伝子を完全体で含んでいる可能性が高いユニットであるが、他の遺伝子をそれほど多く含まないので、解析しやすい大きさであるといえる。4) 最近、メダカBACライブラリーが作成されたが（Matsuda *et al.* 未発表）、コスミドはBACクローンの欠失変異として考えることができる。これを利用して、コスミドレスキューにより、目的の領域を組換え個体を用いずに絞り込むことが可能である。5) 用いたベクターによってはクローニングされにくい領域が存在するため、様々なベクターシステムを用いたライブラリーを作成することが望ましい。などの点から、今回作成したメダカコスミドライブラリーは有用なものだと考えている。また、今回は、HNIシステムを用いてライブラリーを作成したが、その理由と利点について次に示す。1) メダカで単離されている突然変異体は殆どが南方系由来である。遺伝的マッピングでは、遺伝的に離れた南



方系と北方系間での掛け合わせを行うことが多い。その場合、野生型である北方系 HNI 特異的マーカーが得られることも多いため、HNI 系統のライブラリーが必要である。2) 遺伝的背景が異なる系統のライブラリーが多く存在することが望ましい。亜種などが多いメダカにおいて様々な進化学的解析に利用できる。3) 南方系と北方系の両系統間には多くの多型が存在するが、多型は様々な解析に利用できる(南方系の変異体に HNI のゲノムクローンを導入した場合など、多型を利用して選別可能である)。

クローニング効率は、 $\sim 9.1 \times 10^6$  cfu/ $\mu$ g インサート DNA と、通常報告されている効率と同レベル、もしくはそれ以上であった (Evans *et al.* 1989)。これは、インサート DNA のサイズ分画を行った為であると考えられる。今回使用した SuperCos1 ベクターは、サイズ分画を行わなくともある程度高い効率で組換え体を得られるよう構築されたものであるが、サイズ分画を行わない場合、部分分解の条件設定が困難であり、幾つかの条件で部分分解したものについて各々 packaging して一番良い条件を探索しなくてはならないので、多くの packaging extract を消費してしまうという欠点がある。サイズ分画には、ショ糖密度勾配遠心とゲル電気泳動による2つの方法がある。近年、アガロースは改良されてきており、以前ほど ligation を阻害しなくなってきたことから、今回は簡便なゲル電気泳動を使用した。ゲルからは Agarase を利用して容易に DNA を回収することができるので、多くの組換え体を要する場合には、サイズ分画を行った方が効率良くライブラリーが作成できると考えられる。また、今回ゲル切出しを目的の大きさの部分とさらに大きな部分の2箇所について行ったが、大きな部分の DNA を使用した方が高いクローニング効率を得ることができた。これは、ゲル電気泳動によるサイズ分画が完璧ではなく小さな断片が残っており、それが ligation 反応を競合的に阻害してしまうためと考えられる。

作成したコスミドライブラリーの一部を 384 穴マイクロタイタープレートに整列化した (図 2-3)。整列化することによって、各クローンを数値化して半永久的に管理することが可能となる、ハイブリダイゼーション法による陽性クローンの同定が容易になる、プレートを 3 次元に配置して各々の軸に対する DNA mixture を調製することにより PCR 法を用いたスクリーニングが可能となる、等の利点がある。今回植え継ぎを行ったウェルのうち、0.9 % が培養後に菌が増殖してこなかったが、これは拾ったコスミドクローンが増殖してこなかったためではなく、適切なコロニー



を拾わなかった（サテライトコロニーを拾ってしまった）、もしくはそのウェルに植え継ぐことを忘れてしまったという人為的なミスによるものだと考えている。レプリカを取る段階では、オリジナルのプレートで増殖しているウェルについては、ほぼ100%レプリカプレートでも増殖してきた。人の手でコロニーのピックアップを行ったために起こるもう一つのミスとして、同じウェルに異なる2クローンを植え継いでしまうことがあげられる。今回、その割合は1.5%であったが、そのような恐れのあるウェルを全て記録することによって対処した。この場合、陽性シグナルが得られたウェルのクローンについてはシングルコロニーを単離すべきである。しかし、このようなミスは、接触して生えている2個のコロニーを1個として認識してしまうことなどによりロボットでも起こりうる。また、クローンによって増殖速度が様々である（コロニーの大きさが異なる）が、ロボットを使用した場合、小さなコロニーを認識せず拾えないこともある。この場合、バイアスがかかってしまい、ライブラリーに偏りができてしまう恐れがある（最近では改良されて性能が良くなっているらしいが）。今回は、人の手により、小さなコロニーもできる限りピックアップしたため、そのようなバイアスが生じる可能性は低いと考えられる。

メダカゲノムサイズを800 Mb、コスミドライブラリーの平均インサートサイズを約40 kbとすると、 $2 \times 10^4$ 個のコスミドで1ゲノムをカバーしていることになる。整列化したライブラリーは12万クローン強であり、計算上これはメダカハプロイドゲノムを6倍以上カバーしている。N個の独立の組換え体のランダムなライブラリーの中に特定のDNA配列が含まれる確率に関する公式（Clarke and Carbon 1976）を使用すると、今回整列化したコスミドライブラリー中にある特定の配列が含まれる確率（目的のクローンが得られる確率）は、99.8%である。実際、18個のSTSマーカーについて1stスクリーニング（Z mixスクリーニング）を行った結果、全てのマーカーについてそれらを含むコスミドクローンが存在していることが確認された（表2-1）。しかし、3rdスクリーニングまで行い、クローン数まで調べたマーカーは少ないため、実際にハプロイドゲノムを6倍カバーしているかについては今のところ不明である。これは、以下に示す計算で間接的に推測することができる。Clarke and Carbon (1976)の計算式を使用すると、1段のZ段（24576クローン）にある特定の配列が含まれる確率は、70.7%である。従って、5段（Z1~Z5）あるZの中で、陽性シグナルが得られるZ段の数は平均3.5個（ $5 \times 0.707$ ）である。実際にZ mixスクリーニングを行った18個のSTSマーカーについて計算すると、陽性だったZ段の数



は平均3.2個であった(表2-1)。これは、1段のZ段が20433クローン分の時、あるいはゲノムサイズが約1000 Mbの時に期待される値であるが、調べた例数が少ないため、今のところ確証はない。最初の仮定が正しいときにも十分有り得る値である( $p=0.16$ )。

迅速に目的のクローンが得られるように、コスミドライブラリーのPCRスクリーニング系の確立を行った。その結果、2日で目的のクローンを単離することが可能となった(図2-5)。また、今回作成した系の場合、半日(1回のPCR反応)で、ライブラリー中にクローンが存在するか否かが分かる。しかし、2ndスクリーニング(X軸Y軸スクリーニング)時に、陽性シグナルが2個以上、特に3個以上得られたときには手間を要した。1段のZに陽性クローンが $n$ 個存在していた場合に、3rdスクリーニングを行うプレート数は最大 $n^2$ になる。3rdスクリーニング時には1枚のプレートあたり40(横24+縦16)反応分のPCRを行うことになるため、これは軽視できない。従って、1段のZ段あたり目的のクローンが0個か1個、多くとも2個以内であることが望ましいことになる。今回作成した1段のZ段に含まれるクローン数は24576個である。この場合に、1段のZ段に陽性クローンが $n$ 個存在する確率( $r$ )は、次の関係式を用いて統計的に計算できる。 $r = {}_q C_n (p-1)^{q-n} \times 1^n / p^q = ({}_q C_n / p^q) \exp(q/p)$  ( $n \ll p, q$ )、 $p$ は1ハプロイドゲノムをカバーするクローン数、 $q$ はDNA mixあたりのクローン数である(Asakawa *et al.* 1997)。この式に基づいて計算すると、確率( $r$ )は、 $n=0$ の時に $r=0.293$ 、 $n=1$ の時に $r=0.360$ 、 $n=2$ の時に $r=0.221$ 、 $n=3$ の時に $r=0.090$ となる( $p=20000$ ,  $q=24576$ )。従って、1stスクリーニングで陽性だったZ段のうち17.8% [ $1 - \{(0.360+0.221)/0.707\}$ ]で、陽性クローン数が3以上となってしまふ。これは高い確率で混乱が生じることを意味している。従って、PCRスクリーニング用のプレートの座標付けについては改良の必要性がある。例えば、4(X) × 4(Y) × 20(Z)の軸に整列した場合を考えると、1stスクリーニング(Z mixスクリーニング)に20チューブのPCR反応を行うことになり、1チューブあたり(1段のZ段あたり)6144クローン分に相当する。この場合、1段のZ段(6144クローン)にある特定の配列が含まれる確率は、26.5%である。また、上式を利用して計算すると、1段のZ段に陽性クローンが $n$ 個存在する確率( $r$ )は、 $n=0$ の時に $r=0.736$ 、 $n=1$ の時に $r=0.226$ 、 $n=2$ の時に $r=0.035$ 、 $n=3$ の時に $r=0.004$ となる( $p=20000$ ,  $q=6144$ )。従って、1stスクリーニングで陽性だったZ段のうち陽性クローン数が3以上となってしまふ確率は、1.5% [ $1 - \{(0.226 + 0.035)/0.265\}$ ]と



非常に低くなる。

次に、あるマーカでスクリーニングを行った際に必要なPCR反応数（2ndスクリーニングまで）を考えてみると、今回作成したDNA mixを使用した場合（ $8(X) \times 8(Y) \times 5(Z)$ の軸に整列した場合）、1stスクリーニングに5本、平均3.5個の陽性クローンが得られ、2ndスクリーニングには1段のZ段あたり16本（ $8(X) + 8(Y)$ ）のPCRを行うことになるので、計61（ $5 + (3.5 \times 16)$ ）本のPCR反応が必要である。一方、 $4(X) \times 4(Y) \times 20(Z)$ の軸に整列した場合、同様に計算すると計62.4（ $20 + (5.3 \times 8)$ ）本となり、ほぼ同本数である。よって、後述した方法の場合、Z段あたりの陽性クローン数が少なくなるため、混乱が減少し、結果として3rdスクリーニングまで行ったときのPCR反応数も少なくなり、手間と時間も短縮されることが考えられる。



### 第三部：Da 遺伝子近傍の物理的地図の作成



## 緒言

ポジショナルクローニングの手法を行うには、原因遺伝子座位の同定、その領域のゲノムDNAのクローン化、目的の遺伝子の探索、同定、という3つのステップを順次行うことになる(図1-2)。2番目のステップであるゲノムDNAのクローン化時には、ライブラリーのスクリーニングを繰り返して染色体歩行を行い、目的の領域の物理的地図を作成する。次に、実際に必要な領域についてさらに詳細に解析を行う。

染色体歩行(chromosome walking)はクローン化されたDNAを次々にスクリーニングして連結する方法の一つである(Bender *et al.* 1983)。この方法は、遺伝子座が分かっているが機能が未知である遺伝子を単離するために開発された。具体的には次のことを行う。まず、開始点となるマーカーをプローブとしてゲノムライブラリーをスクリーニングする。次に、得られたクローンを並べ、端に位置するクローンの末端プローブを合成し、再度ライブラリーのスクリーニングを行う。これを目的の領域に到達するまで繰り返す。このようにしてあるスタート地点から両方向に染色体歩行を行うことにより、コンティグが作成される。

染色体歩行を行い、物理的地図を作成するのは非常に多くの手間と時間を必要とする。これらを効率的に行うためには、できる限り大きなインサートを含むゲノムライブラリーを使用し、迅速なスクリーニング法を用いてクローンを単離することによって克服される。BACベクターは300 kbものインサートをクローニングすることが可能であり(Shizuya *et al.* 1992など)、様々な生物でゲノムライブラリーの作成に用いられ、物理的地図の作成に使用されている。また、近年、ライブラリーをマイクロタイタープレート上に整列化し、フィルターにグリッドすることによって、迅速に目的のクローンが得られるシステムが使用されるようになってきた(Nizetic *et al.* 1991; Nizetic *et al.* 1994)。また、整列化したライブラリーからDNA mixtureを調製し、PCR法を用いて更に迅速に目的のクローンをスクリーニングすることも可能となった(Chumakov *et al.* 1992; Shepherd *et al.* 1994; Kim *et al.* 1996; Asakawa *et al.* 1997)。

目的の領域のゲノムクローンが得られた後は、さらに絞られた領域について詳細な解析を行うことになる。この時に、BACクローンのままでの解析も可能であ



るが、インサートサイズが大きい場合には、非常に多くの制限酵素断片が生じるなどして少々困難である。その際には、コスミドなどの少し小さめなクローンにサブクローニングするなどして解析を行うこともある。また、コスミドレスキュー法などを用いて目的の領域をさらに絞り込むことが可能である (Kurooka *et al.* 1996; Yan *et al.* 1998)。

最近、メダカにおいても整列化BACライブラリーが作成された (Matsuda *et al.* 未発表)。使用された系統は南方系のHd-rR系統であるため、北方系のHNI系統特異的マーカーを利用する本研究の場合、利用しやすさにやや難点が考えられる (BACクローンの末端配列からSTS primerを設定する際など) が、インサートサイズは平均230 kbと十分大きなものである。また、本研究の第二部では、北方系HNI系統を使用した整列化メダカコスミドライブラリーも作成された (図2-3)。コスミドライブラリーはPCR法を用いて迅速なスクリーニングを行うことが可能である (図2-5)。従って、メダカでも染色体歩行を行う為に必要なリソースが整備されたと言える。

本研究の目的は、ポジショナルクローニングの手法を使用してメダカ突然変異体*Da*の原因遺伝子を単離することである。これまでに、*Da*遺伝子をLG VIIIにマッピングし、染色体歩行の開始点となりうる2個のマーカーを得た (stsM02-5とstsB07-3)。今回、メダカBACライブラリーを利用して染色体歩行を行い、BAC、コスミドクローンを用いて*Da*遺伝子領域のコンティグマップを完成させた。また、組換えバッククロス個体を使用して*Da*遺伝子を含む最小領域を決定した。



## 材料及び方法

### 1. 間期核へのfluorescent *in situ* hybridization (FISH)

メダカ成体1匹を、氷上で冷やしたホモジェナイザーを用い、PBS (phosphate-buffered saline) 中でホモジェナイズした。5 min氷上に放置し、15 mlのチューブに上清を移した。1000 rpm, 5 min遠心し、上清を除いた。チューブを穏やかに攪拌しながら、14 ~ 15 mlまでゆっくりと0.4 % KClを加え、30 min放置した。1000 rpm, 6 min, 4 °C遠心し、500  $\mu$ lを残して上清をアスピレート後、タッピングした。固定液 (カルノア液; 酢酸:メタノール=1:3) を同様にゆっくりと加え、30 min放置後、遠心して上清を除いた。これを3回行った。上清をほとんど除いた後、スライドガラス上に一滴の細胞液を落下させ、乾燥した。

プローブのラベリングはニックトランスレーション法を用いた。コスミド DNAを1  $\mu$ g、5  $\mu$ lの10  $\times$  buffer (0.5 M Tris-HCl pH7.8-8.0, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mg/ml BSA)、各0.5 mMのdAGCを5  $\mu$ l、0.5 mMのbiotin-16-dUTPか0.5 mMのdigoxigenin-11-dUTPを5  $\mu$ l、0.1 M 2-mercaptoethanolを5  $\mu$ l、2  $\mu$ g/ml DNase Iを6  $\mu$ l、10 U/ $\mu$ l *E. coli* DNA polymerase Iを2  $\mu$ l混合し、DWで全量を50  $\mu$ lにした。15 °Cで2 hr反応後、少量を電気泳動して200 bp前後に切断されていることを確認した。2.5  $\mu$ lの0.5 M EDTAと1  $\mu$ lの10 % SDSを加えて反応を止め、DWで50  $\mu$ lに合わせた。68 °C、15 min処理し、スピнкаラムを通した。次に、3  $\mu$ lのDNAプローブと2  $\mu$ gのHNIゲノムDNAを混合しDWで16  $\mu$ lにした後、1.6  $\mu$ lの3 M酢酸ナトリウム (pH5.2) と40  $\mu$ lのエタノールを加え-20 °Cで20 min静置した。15000 rpm, 4 °C, 20 min遠心し、70 %エタノールでリンスした。沈殿に100 % formamide 5  $\mu$ lを加え、10 min以上ボルテックスにかけ、20 % 硫酸デキストラン (in 2  $\times$  SSC) 5  $\mu$ lを加え、さらに10 min以上ボルテックスにかけた。

次に試料DNAを変性した。スライドを58 °Cで40 min乾燥させた。スライドは、70 °Cの70 % formamide/2  $\times$  SSCの入ったコプリンジャーに移し、2 min変性処理をした。スライドを-20 °Cの70 %エタノールに浸して5 min室温に放置し、90 %エタノールで5 min、99.5 %エタノールで5 min室温に放置した後、室温で乾燥させた。



スライドの準備が整ったところで、DNAプローブを78 °Cで10 min処理した。ボルテックス10 sec処理して凝結した水分を混合した後、37 °C, 10 minインキュベートし、全量を変性処理スライドにのせた。カバーガラスを気泡が入らないようにのせ、シールした。37 °Cで一晩ハイブリダイズさせた。

カバーガラスを取り、40 °Cの洗浄液1 (50 % formamide/2 × SSC) の入ったコプリンジャーに移し5 min室温で振とうした。新しい40 °Cの洗浄液1にして、室温でさらに5 min振とうした。さらに1回繰り返した後、61 °Cの洗浄液2 (0.1 × SSC) を加え、室温で5 min振とうした。これをさらに2回繰り返した。スライドをコプリンジャーから取り出して水分を切り、ブロッキング溶液 (3 % BSA/4 × SSC/0.1 % Tween20) 150 μlをのせてカバーガラスをのせた。37 °Cで30 minインキュベートした。カバーガラスを取り外し、蛍光物質の入った検出溶液 (1 % BSA/4 × SSC/0.1 % Tween20) をのせ、再度カバーガラスをして37 °Cで30 minインキュベートした。カバーガラスを外し、42 °Cの洗浄液3 (4 × SSC/0.1 % Tween20) の入ったコプリンジャーに入れ、室温で5 min振とうした。洗浄をさらに2回繰り返した。スライドをDAPI溶液 (200 ng/ml DAPI in 2 × SSC) に移して室温で5 min振とう後、1/2希釈した洗浄液3の入ったコプリンジャーに移して2 min室温で振とうして洗浄した。水分をよく切って40 μlの抗退色剤 (0.233 g DABCO, 800 μl DW, 200 μl 1 M Tris-HCl pH8.0, 9 ml glycerolを混合したもの) をスライドにのせ、カバーガラスをして検鏡した (図3-1)。

## 2. メダカBACライブラリー

メダカBACライブラリーは、Matsuda *et al.*によって作成されたものである。使用されたメダカはHd-rR純系系統 (Hyodo-Taguchi and Sakaizumi 1993) で、雌は白色 (遺伝子型はbb, XrXr)、雄はオレンジ色 (遺伝子型はbb, XrYR) の表現型を示す。BACライブラリーは、Hd-rR純系メダカの精子DNAより構築された。BACベクターはpBAC-Lac (Asakawa *et al.* 1997) が使用されている。

## 3. BACライブラリーのスクリーニング



メダカBACライブラリーの高密度コロニーフィルターは、名古屋大学堀寛教授より譲与されたものを使用した。送られてきたコロニーメンブレンは、コロニーを固定して乾燥した状態のものであった。まず、スクリーニングに用いるためにメンブレンの調製を行った。alkali lysis buffer (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) で濾紙を湿らせ、その上にコロニー面が上になるようにメンブレンを移し、室温で10 min 放置した。UV Stratalinker 2400 (STRATAGENE) を用いてUV固定した。コロニー溶解buffer液 (50 mM Tris-HCl pH 8.0/ 50 mM EDTA/ 100 mM NaCl/ 1 % N-Lauroylsarcosine Sodium Salt) にメンブレンを浸し、37 °Cで1 hr インキュベートした。ペーパータオル上にメンブレンを移して、乾熱オーブンで80 °C、2 hr 処理し、DNAを固定した。。

プローブ合成のテンプレートにはゲノムDNAから増幅したSTS-PCR産物を用いた。PCR産物を0.8 %低融点アガロースゲルで泳動後、切出しを行い、回収した。電気泳動にて濃度を確認し、テンプレートとして使用した。プローブは $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTPで放射線ラベルした。ラベリングにはMultiprime DNA labelling system (amersham pharmacia biotech) を使用した。primerにはSTS primerを用いた。反応後のプローブは、MicroSpin S-400 HR Columns (Pharmacia Biotech) でfreeの $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTPを除き、ハイブリダイゼーションには全量使用した ( $2.3 \sim 4.2 \times 10^8$  cpm /  $\mu$ g プローブDNA) 。

ハイブリダイゼーションは以下の条件で行った。まず、メンブレンを2 × SSCでwashした後、prehybridization mixture (7 % SDS; 0.5 M NaPO<sub>4</sub>; 100  $\mu$ g/ml salmon testis DNA) 中で60 °C, 3 hr プレハイブリダイズした。次にprehybridization mixtureを除き、新たにhybridization mixtureを加え、95 °C, 5 min denatureしたプローブを加えて60 °Cで16~18 hrハイブリダイズした。ハイブリダイズ後のメンブレンは、2 × SSC/0.1 % SDSで2回リンスし、2 × SSC/0.1 % SDSで50 °C, 15 min, washし、メンブレンのバックグラウンドの放射能が高いものについてはさらに0.5 × SSC/0.1 % SDSで55 °C, 20 min, washした後に2 × SSC/0.1 % SDSでリンスを行った。

#### 4. BAC DNAの回収



BAC DNAの回収は、通常のアルカリミニプレップ法で行った。BACクローンは約200 kbと大きく、物理的に剪断しやすいことが考えられたため、vortexを避けできる限り穏やかに扱い、チップは先端をカットしたものをを用いた。SB培地 (Chloramphenicol 13.6  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 20 mlにシングルコロニーを植え次ぎ、37 °Cで一晩培養した。4500 rpmで15 min遠心した後上清を除き、ペレットを1 mlのsolution I (50 mM グルコース/ 25 mM Tris-HCl pH 8.0/ 10 mM EDTA pH 8.0) にsuspendした。solution II (0.2 N NaOH/ 1 % SDS) を2 ml加えチューブを3~4回反転させて混合し、氷中に5 min放置した。solution III (3 M KCOOH pH 4.8) を1.5 ml加え、チューブを3~4回反転させて氷中に置いた。6000 rpm, 20 min, 4 °Cで遠心後、上清を別のチューブに移して、フェノール/クロロホルム、クロロホルム/イソアミルアルコール処理を1回ずつ行い、イソプロパノール沈澱した。ペレットを400  $\mu\text{l}$ の10T0.1E (10 mM Tris-HCl pH 8.0 / 0.1 mM EDTA) に溶解し、1.5 mlチューブに移してエタノール沈澱を行った。100  $\mu\text{l}$ の10T0.1Eに溶解し、RNaseA (SIGMA) を10  $\mu\text{g}$ 加えて37 °C、1 hr、RNase処理を行った後、等量の13 % PEG/1.6 M NaClを加えて氷上で1 hr以上放置しPEG沈した。ペレットは70 %エタノールでリンス後、20  $\mu\text{l}$ のTE bufferに溶解した。

## 5. BACクローンの末端シーケンス

回収したBAC DNAのうち10  $\mu\text{l}$ をNot Iで切断し、フェノール/クロロホルム処理を2回、クロロホルム/イソアミルアルコール処理を1回行い、エタノール沈澱した。ペレットは10  $\mu\text{l}$ の10T0.1E (10 mM Tris-HCl pH 8.0 / 0.1 mM EDTA) に溶解した。電気泳動とspot checkで濃度測定を行い、シーケンス反応のテンプレートとして用いた。1シーケンス反応に、300 ng~1  $\mu\text{g}$ のテンプレートを使用した。primerはM13M4 (GTTTTCCAGTCACGAC) と、M13RV (CAGGAAACAGCTATGAC) を用いた。シーケンスキットはABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) を使用し、20  $\mu\text{l}$ のスケールで、96 °C, 5 minのdenature後、96 °C, 5 min, 50 °C, 5 sec, 60 °C, 4 minを30 cycles反応させた。反応産物はイソプロパノール沈澱を行い、80



%エタノールでリンス後、15  $\mu$ lのTSRに溶かした。96 °Cで2 min、denatureし、Applied Biosystems Model 310 DNA sequencerで泳動し、解析を行った。

## 6. BACクロンのオーダリング

本研究で使用したBACライブラリーは、pBAC-Lacベクター (Asakawa *et al.* 1997) のHind IIIクロニングサイトに、メダカゲノムをHind IIIで部分分解した断片を挿入したものである (Matsuda *et al.* 未発表)。従って、BACクロンをHind IIIで切断することにより、ベクター部分が一本に切り出され、メダカインサートDNAは多くのHind III断片に分解される。この時、部分的に重なり合うクローン間では、これらの断片の多く、または一部を共有しているはずであり、重複領域が大きい場合には、隣り合うクローンであることを容易に判断することが可能である。また、コンティグの末端に位置するクローンのHind III断片は、同じコンティグに含まれる他のクローンのHind III断片には存在しない独自のHind III断片を持つことになる。

回収したBAC DNAのうち1  $\mu$ lをHind IIIで切断し (37 °C, 3 hr)、0.8 %アガロースゲルで電気泳動することによって、クローンのオーダリングを行った(図3-2)。

## 7. コスミドクロンのスクリーニング

コスミドクロンのスクリーニングについては、第二部で記述したPCRスクリーニング法を使用した。マーカーは、BAC、またはコスミドクロンの末端配列をもとに設定したSTSマーカーを用いた。

## 8. 染色体歩行、*Da*遺伝子を含む最小領域の決定

オーダリングしたBACコンティグの両端に位置するクローンの末端の塩基配列をもとに、約300 bpを増幅するようなSTS primer setを設定した (各コンティグ



あたり4マーカー)。HNI系統と*Da*変異体のゲノムDNAをテンプレートとしてPCRを行い、両系統から増幅することを確認した。BACインサートは南方系のHd-rR系統由来であるため、幾つかのマーカーは*Da*からのみ増幅された。HNI系統から増幅されなかったものについては、新たにprimerを設定し直し、HNI系統から増幅されてくるprimer setを選んだ。コンティグ内の各BACクローンのDNAに対してこれらのSTSマーカーのPCR法を行い、コンティグの両端に位置するマーカーを選出した(各コンティグあたり2マーカー)。これらのマーカーは、制限酵素切断、またはシーケンスを行うことにより、両系統間の多型を検索した。RFLP部位が存在しなかったマーカーについては、HNI系統特異的に増幅するprimer setを設定した。これらの多型性STSマーカーについて、組換えバッククロス個体を用いてタイピングを行い、組換え点を越えたか否かの情報をもとに染色体歩行の方向を決定した。次に、*Da*遺伝子の方向に位置するSTSマーカーをプローブとしてBACライブラリーのスクリーニングを行い、染色体歩行を行った。

*Da*遺伝子を含む最小領域の決定には、BACおよびコスミドクローンの末端に由来する多型性STSマーカーを用い、組換えバッククロス個体をタイピングすることによって行った。*Da*遺伝子の両側で最も近傍に組換え点を有する2個体のバッククロス個体を選出し、これらの組換え点の位置を調べた。



## 結果

### 1. 間期核へのfluorescent *in situ* hybridization (FISH)

第二部で得られたstsM02-5とstsB07-3を含むコスミドクローン、C003B3とC010P20をプローブとして用いて、間期核に対してfluorescent *in situ* hybridization (FISH)を行った。その結果、両クローンはお互いにかかなり空間的に近接した位置にハイブリダイズした(図3-1)。10細胞以上を観察したが、全て同じレベルの結果となった。従って、これら2個のマーカ-は、同一染色体上に近接して存在していると推測した。

### 2. 染色体歩行

BACライブラリーを用いて、stsM02-5とstsB07-3のマーカ-から染色体歩行を開始した。スクリーニングはハイブリダイゼーションで行い、stsM02-5は8個、stsB07-3は7個の陽性クローンを得た。スクリーニングに用いたSTSマーカ-で得られたクローンのコロニーPCRを行った結果、目的のマーカ-を含んだクローンであることが確認された。BAC DNAを回収しHind IIIで切断、泳動することによって(図3-2)、クローンのオーダリングを行い、コンティグを作成した(図3-3)。その結果、それぞれのマーカ-を含んだコンティグの末端クローンが、stsM02-5についてはB169M3とB155O13、stsB07-3についてはB159E11とB185K13であることが判明した。これらのBACクローンの末端の塩基配列を決定し、STSマーカ-を設定した。調べた全てのSTSマーカ-で、HNI系統とDa変異体間におけるDNA多型が確認された為(表3-1)、組換えバッククロス個体を用いてマッピングを行った。その結果、stsM02-5を含むコンティグについては、STSマーカ-B169M3M4が、Da遺伝子とは反対方向で組換えを起こしている個体のうち3個体の組換え点を越えており、また、STSマーカ-B155O13RVが、Da遺伝子と組換えの見られないDa遺伝子領域に達していることが判明した。stsB07-3を含むコンティグについては、STSマーカ-B185K13M4が、stsB07-3とDa遺伝子との間で組換えを起こしている5個体のう



赤： STSマーカー-M02-5を含む  
コスミドクローン  
(C003B3)

緑： STSマーカー-B07-3を含む  
コスミドクローン  
(C010P20)

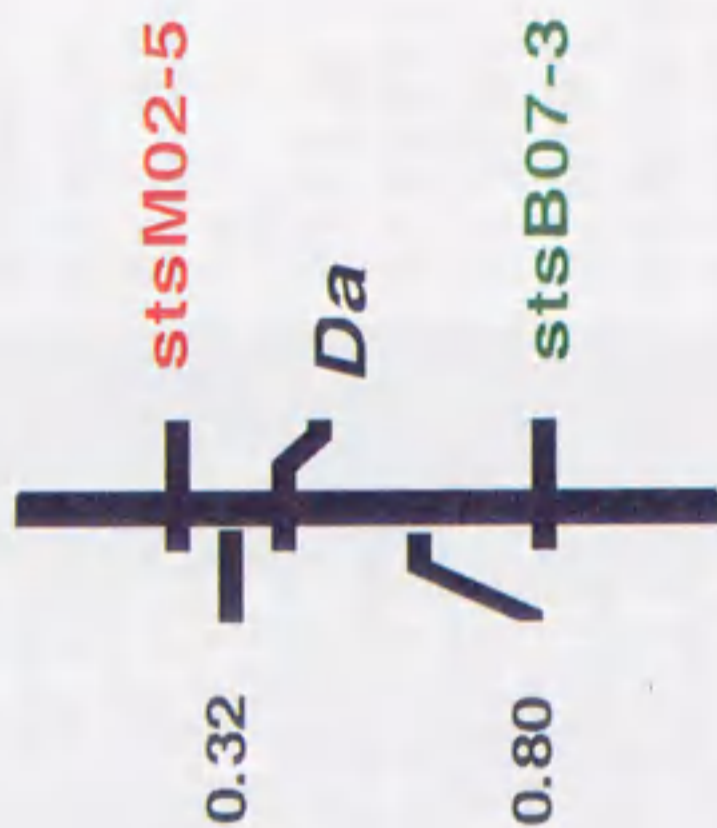
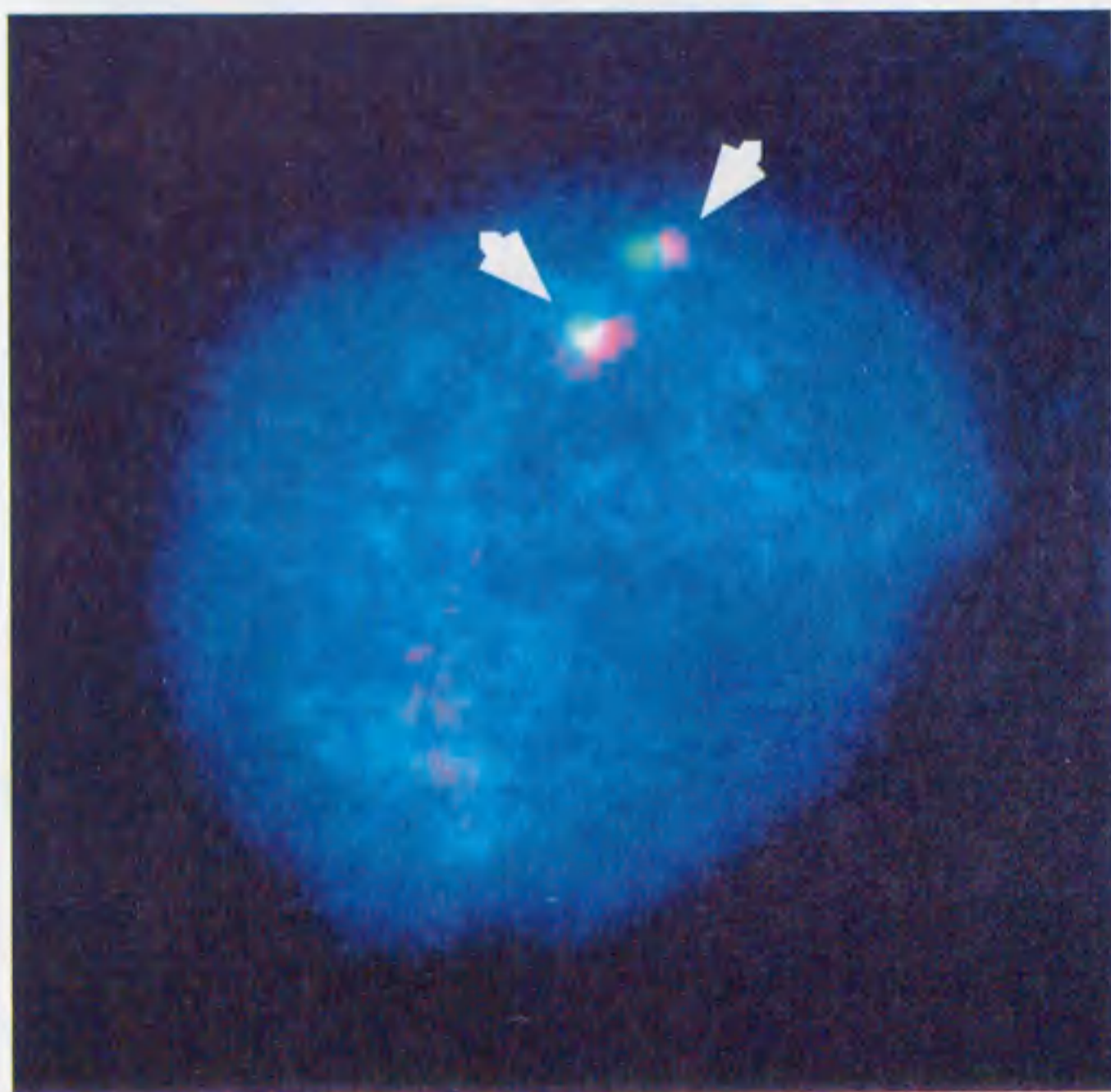


図3-1 コスミドクローンをプローブとした間期核クロマチンへのFISH

Da遺伝子近傍のマーカーstsM02-5を含むコスミドクローン (C003B3) と、 stsB07-3 (C010P20) を含むコスミドクローンをプローブとして、メダカ間期核に対してFISHを行った。赤がC003B3で、緑がC010P20である。核は2nなので、シグナルは2個ずつ確認される。これによって、遺伝学的に近接している両マーカーが物理的に近接して存在することが明らかとなった。



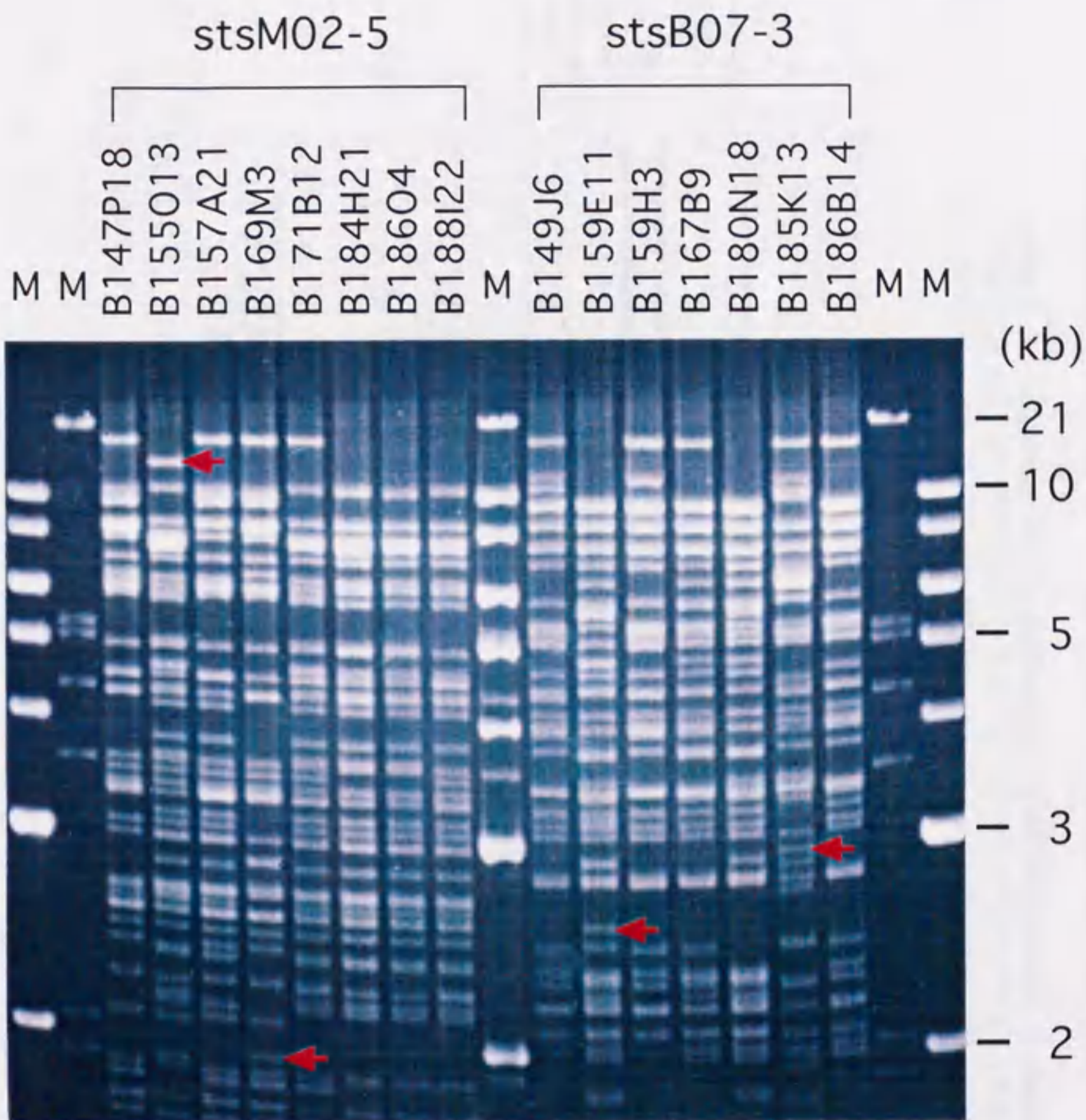


図3-2 BACクローンの *Hind* III切断泳動像

stsM02-5またはstsB07-3を含むBACクローンの*Hind* III切断。重なり合うクローンは同じ*Hind* III断片を共有している。断片の共有の有無によって、クローンの並びを決定する（オーダリングする）ことが可能である。コンティグの末端に位置するクローンには、他のクローンにはない独自の断片（矢印）が見られる。実際のコンティグマップについては図3-3に示す。M: サイズマーカー



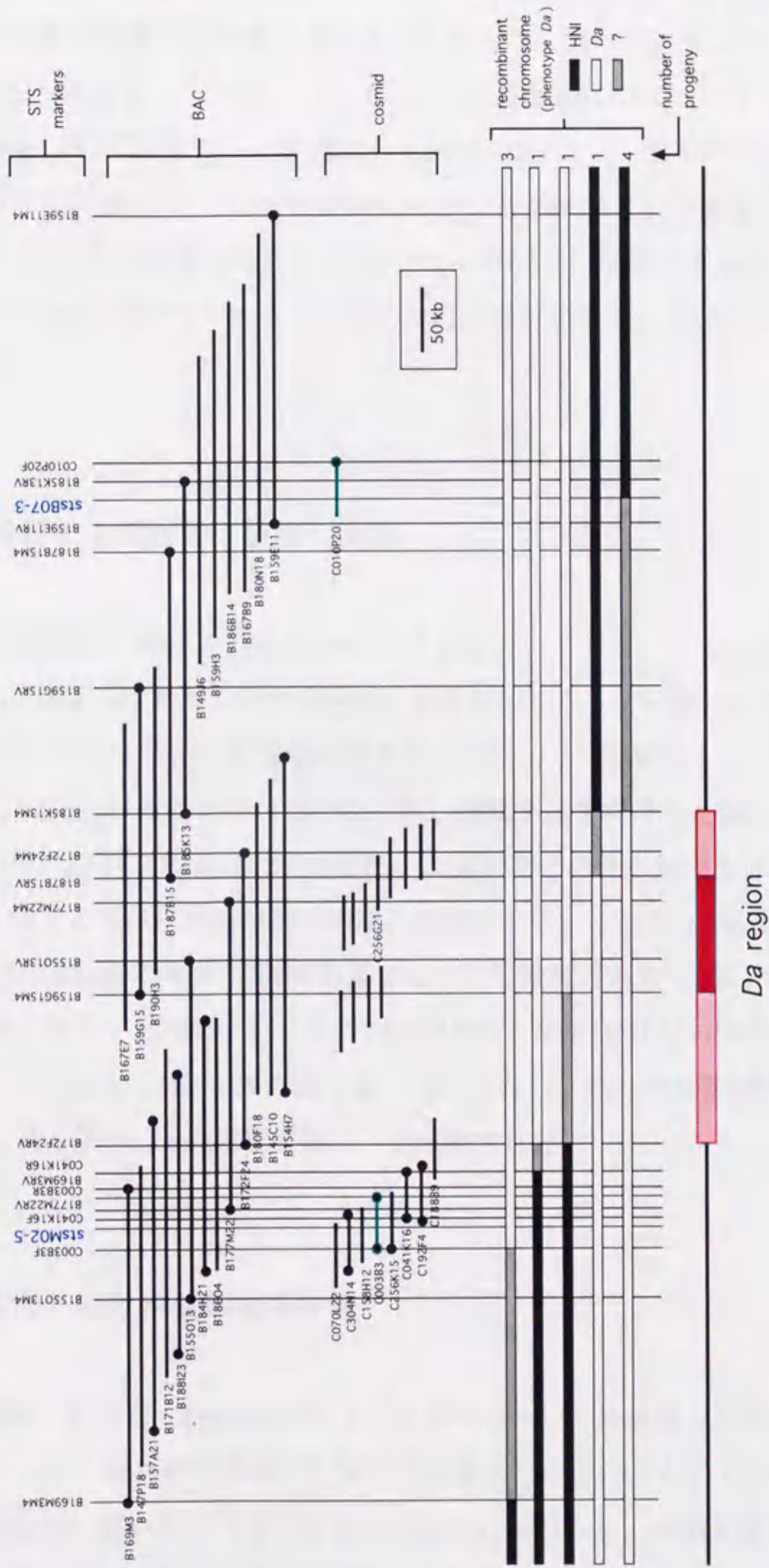


図3-3 BACとコスミドクローンによる*Da* 遺伝子領域のコンテイングマップ

スクリーニングは、BACライブラリーはハイブリダイゼーションで、コスミドライブラリーはPCR法を用いて行った。各クローンの順番は、制限酵素切断とSTSマーカーを利用して決定した。末端シークエンスを行ったものは、クローンの末端を黒丸(●)で示した。組換えバッククロス個体を使用して*Da*遺伝子を含む最小領域を調べた(赤で示した*Da* region)。染色体歩行の開始点である2個のSTSマーカーを青で示す。FISHに使用したコスミドクローンを緑で示す。



ちの4個体の組換え点を越えていた。よって、stsM02-5を含むコンティグではB155O13RV、stsB07-3を含むコンティグではB185K13M4が、染色体歩行を進めるべき*Da*遺伝子領域の方向であることが明らかとなった。そこで、B155O13RVとB185K13M4のマーカークをプローブとして、再度BACライブラリーのスクリーニングを行い、新たに9クローンを得た。その中の8クローンがB155O13RVを、7クローンがB185K13M4のマーカークを含んでいることがPCRにより確認され、コンティグが結合したことが示唆された。各クローンのHind III切断パターンと、新たに設定したいくつかの末端STSマーカークを用いたPCR解析により、コンティグマップを作成した(図3-3)。

### 3. *Da*遺伝子を含む最小領域の決定

塩基配列の決定を行ったBACまたはコスミドクローンの末端にSTSマーカークを設定し、*Da*のみでなくHNI系統からも増幅してくるマーカークの多型を検索した。調べた全てのマーカークで多型が同定され(表3-1)、組換えバッククロス個体を用いてマッピングを行うことが可能となった。組換え体を利用した解析の結果、STSマーカークB159G15M4とB187B15RV間では*Da*遺伝子との間の組換え体はなく、B172F24RVとB159G15M4間で組換えを起こしている個体が1個体、B185K13M4とB187B15RV間の組換え体があることが確認された(図3-3)。従って、*Da*遺伝子を含む最小領域は、最大B172F24RVからB185K13M4の間、最小B159G15M4とB187B15RVの間であった。これは、物理的な距離としては、最大約250 kb、最小約70 kbに相当することが示唆された。

### 4. *Da*遺伝子近傍の塩基配列情報

図3-3 に示したBACまたはコスミドクローンの末端のうち34 末端のシーケンスを行った。BLASTNを用いた相同性検索を行ったが、全ての末端について、登録された配列と高い相同性を示す配列は得られなかった。多型を検索したものについては、全てのマーカークで多型が確認された。B155O13RV、B159E11M4、



表3-1 BAC、コスミド末端に由来するSTSマーカー

Marker name	Forward primer	Reverse primer	Size (bp)	Polymorphism
B155O13M4	GTAATTTGTGGCTGACGG	CTTCAGAACAAGGAAAGCAC	336	N.D.
B155O13RV	TCAGCCACAAGTTGAGCAG	TCTGCAGGGTGTAACAGG	352	a ( <i>Dde</i> I)
B159E11M4	TTCTCCCAGTTCTAAATTAC	ATCATTCCCCTTACTTGC	269	N.D.
B159E11RV	AAGATCAGTCGCTTCAGTAGTG	GAAGTGTGCTCTGAACGT	246	N.D.
*B159G15M4	GCATTTGACATTTACGGC	TCTGTGTACTCGGCTTGG	297	N.D.
	TGCTCTATTCAGACCTCTGC	GGTATTGACAGTGAACAGCAC	201	a ( <i>Alu</i> I)
B159G15RV	ACACGAGTTTGCTTTGGG	GCTTTCACTCGTTGTGGG	262	N.D.
*B169M3M4	TGGTGCCGATCTGAATG	AATGACAGAGTGGCAGTTCTC	351	b
	TACTGAGGGGATGCAGC	TGACTGAATGTGCGTATTTG	298/310	c
B169M3RV	CTGTTGCTCTGAGATTCC	CTGGTCACATTTCAATGGG	324	N.D.
B172F24M4	GTCATTTGACAGTGAAGTG	GCACTCTCAAACACCTCAG	334	b
B172F24RV	CATTAGTGAGCCATGCCAC	GGGAGTCTTCATGTTTCATCAC	281	a ( <i>Alu</i> I)
*B177M22M4	AAACAATGAATTGCCCCA	TCTCGTCAATACCAGGTGG	289	N.D.
	CCTGAGTCTTGGGAGGGA	TCTCGTCAATACCAGGTGG	264	d
B177M22RV	ATGATCTCCTAATCCTTGTC	CTGCTCCTTATACGCAAC	294	b
B185K13M4	GCAAATGTGTCTTTCATAGCG	ATTCGGCTCCGTGGAAAC	253	a ( <i>Hin</i> I)
B185K13RV	CCTCACAAAGATCTGGG	GCGTACATTGCTGTCATAGTC	286	N.D.
B187B15M4	AAACAGTGCCACTAGGCC	AGCGCACAAATGAGTTGTC	299	b
B187B15RV	AGCACCTTCATCCACATTG	GAATGCTGTGCGAATCTG	251	N.D.
*C003B3F	CACTCGCTCTATCACAATTC	TTTACACCCGTCACTACAC	330	N.D.
	CACTCGCTCTATCACAATTC	CTTTTCTCAGACAGACGTGG	300	N.D.
	CATTGCACTGTTTGGTCC	TTTACACCCGTCACTACAC	366	N.D.
	CATTGCACTGTTTGGTCC	CTTTTCTCAGACAGACGTGG	336	d
*C003B3R	TTCTCCCTATGCAGGCTG	GAGCTGATCAATCTCACAGG	342	d
	TTCTCCCTATGCAGGCTG	CAGGAGTGAATAAATTTGCC	326	d
	GGGTTGATCGCTTTTATGC	GAGCTGATCAATCTCACAGG	299	N.D.
	GGGTTGATCGCTTTTATGC	CAGGAGTGAATAAATTTGCC	283	N.D.
C010P20F	CCGTCCTTGAGCCTGTTTC	TCTCCCTCTACACTTCAAG	228	N.D.
C041K16F	TGCACACAAATCAGCTCTGC	CCCTGGGAGCTCATGAAGCA	164	N.D.
C041K16R	TGACTCACTCCTGATAGCG	TTGCAGGAAAAAGCATGC	229	N.D.

\*: 同じ座位を増幅するいくつかのprimer setを設定した。

a: PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism)

b: 南方系からのみ増幅される南方系系統特異的マーカー

c: PCR増幅産物のsize多型

d: HNI系統からのみ増幅されるHNI系統特異的マーカー

N.D.: 決定していない (調べていない) もの



B159G15M4、B177M22M4とB187B15RVの5個のマーカ-については北方系のHNI系統の塩基配列も決定した。その中で、B177M22M4とB187B15RVに見いだされた多型については、第一部で示したanonymousの配列に存在する多型の頻度（平均30 bpに1個）から期待されるよりもかなり少なかった [B177M22M4 : 1 single nucleotide polymorphism (SNP) / 214 bp ( $p = 0.006$ ), B187B15RV : 1 SNP / 252 bp ( $p = 0.017$ )、 $p$ : 期待値が1/30の場合の確率]。



## 考察

本研究では、間期核へのFISHを行い、*Da*遺伝子近傍に位置する2個のマーカ― (stsM02-5とstsB07-3) が物理的にも近傍に連鎖していることを明らかにした後、これらのマーカ―から染色体歩行を開始し、*Da*遺伝子を完全に含む領域のコンティグマップを作成することに成功した。また、BACやコスミド末端配列に由来する多型性STSマーカ―と組換えバッククロス個体を利用し、*Da*遺伝子を含む最小領域を決定した。

第一部で作成した遺伝的連鎖地図から、stsM02-5とstsB07-3間の距離は物理的に約500 kbであることが推測されていた。間期核FISHの解像度が50 kb ~ 1 Mbであることから (Heiskanen *et al.* 1996) それは示唆された。もしこの推測が正しかった場合には、今回使用したBACライブラリーの平均インサートサイズが230 kb程度 (Matsuda *et al.* 未発表) であることから、両マーカ―から1~2回の染色体歩行を行うだけで*Da*遺伝子領域をカバーすることができると考えられた。実際には、1回の染色体歩行を行ったのみで両マーカ―からのコンティグを結合することに成功した。図3-3 に示したBACクローンの並びから、stsM02-5とstsB07-3間の実際の物理的距離は約500~600 kbであると考えられ、遺伝的連鎖地図からの予測とほぼ一致していた。*Da*遺伝子近傍の領域における遺伝的距離と物理的距離の関係がメダカゲノムで一般的なものか否かはまだ分からないが、もしそうである場合には、450 kb/cMという値は良い目安となるだろう。また、第一部で考察したように、625個体のバッククロス個体を用いた場合、平均72 kb に1組換え体が存在する計算になる。従って、*Da*遺伝子を含む最小領域も70 kb程度になることを期待したが、実際はそれ以上であり250 kbを越えてしまう可能性も考えられた。しかし、推測した値も95%信頼区間では400 kb以内となることから、250 kbという値は十分考えうる範囲内である。

今回行ったシーケンスの平均読取鎖長を430 bpとすると、全て含めて約14.6 kb ( $0.43 \times 34$ ) をシーケンスしたことになる。メダカゲノムには、平均13.3 kbに1個の遺伝子が存在すると期待されることから、幾つかの配列については遺伝子を含んでいる可能性が考えられた。しかし、塩基配列を決定した34末端の全において既知の配列との相同性を示さなかった。タンパク質をコードする塩基配



列の平均長がヒトと同じで約1.5 kbであると仮定すると、メダカゲノムの11.3% (1.5 / 13.3) がコード配列を含んでいる計算になる。従って、34箇所の独立した塩基配列のうち平均3.8個がコード配列となる。この場合、34箇所全てがコード配列を含まない可能性は低い ( $p = 0.034$ )。このことから、*Da*遺伝子近傍の領域が遺伝子密度の低い領域であり、今回シーケンスした領域がコード配列を含んでいなかった可能性と、コード配列は含んでいたが、他生物種との間で保存されていない領域だったか、新規遺伝子であった可能性が考えられる。177M22M4とB187B15RVの両マーカーは、多型の存在頻度が期待値よりもかなり低かった。相同性検索からは相同性を示す既知の配列は得られなかったが、機能的に重要な配列である可能性(新規遺伝子である可能性も含め)も考えられる。

*Da*遺伝子を含む最小領域は、図3-3のコンテイングマップから70~250 kb以内であることが示唆された。これは、さらなる組換え個体を用いた詳細なマッピングにより、おそらく1個のBACクローンでカバーされるものと期待される。次のステップとして、この中に含まれる遺伝子から*Da*遺伝子を単離しなくてはならない。メダカゲノム中に約6万個の遺伝子があると仮定すると、メダカハプロイドゲノムサイズは800 Mbなので、250 kbのBACクローンの中には平均18~19個の遺伝子を含む計算になる(1遺伝子/13.3 kb)。250 kb中に含まれる遺伝子を探索する方法としては、全塩基配列を決定してエクソン予測プログラムや相同性検索を利用することや、cDNA選択法(Lovett 1994)を用いて発現遺伝子を単離する方法などが考えられる。

cDNA選択法は発現部位と時期が正確に分かっている場合には有効な手段であるが、*Da*遺伝子が発現する時期は今のところはっきりしていない。*Da*遺伝子近傍の他の遺伝子が単離されれば、ヒトのシンテニックな領域を検索して*Da*遺伝子の候補遺伝子を推測することも可能であるが、直接的で確実な方法ではない。

全塩基配列を決定することは、もれなく*Da*遺伝子を探索できる確実な方法である。また、今回決定した*Da*遺伝子を含む最小領域は、確実に*Da*遺伝子の全長を含むとは限らなく(変異部位は確実に含んでいるはずだが)、ヒトのジストロフィン遺伝子(2.4 Mb)(Koenig *et al.* 1987)のように非常に大きな遺伝子である可能性も考えられるが、そのような場合にも遺伝子の一部の塩基配列は決定されるという意味でも確実である。しかし、18個もの遺伝子が存在していた場合、その中から配列情報のみで*Da*遺伝子を同定することはかなり困難である。

*Da*遺伝子であることを証明する唯一の方法としては、変異体に野生型のDNA



を導入することによるレスキュー法が考えられる (図3-4)。これは、レスキューされた場合に、確実に *Da* 遺伝子を含んでいると言えるため、大変有力な方法である。また、コスミドクローンをBACクローンの欠失変異体系列と考え、どのコスミドクローンが表現型をレスキューするかを調べることにより、組換え体を用いずに *Da* 遺伝子領域を絞り込むことが可能である。BACやコスミドクローンをを用いたトランジェントレスキュー法については、ゼブラフィッシュの *floating head (flh)* 変異体で試みられ成功している (Yan *et al.* 1998)。 *Da* 変異体は発生途中 (受精後3日目) で表現型が現れてくるため、 *flh* 変異体のようなトランジェントレスキュー法も十分可能であると考え (Ekker 1999)。これらのことから、今後は全塩基配列の決定とBAC、コスミドレスキュー法を平行して行い、 *Da* 遺伝子を同定することを考えている。



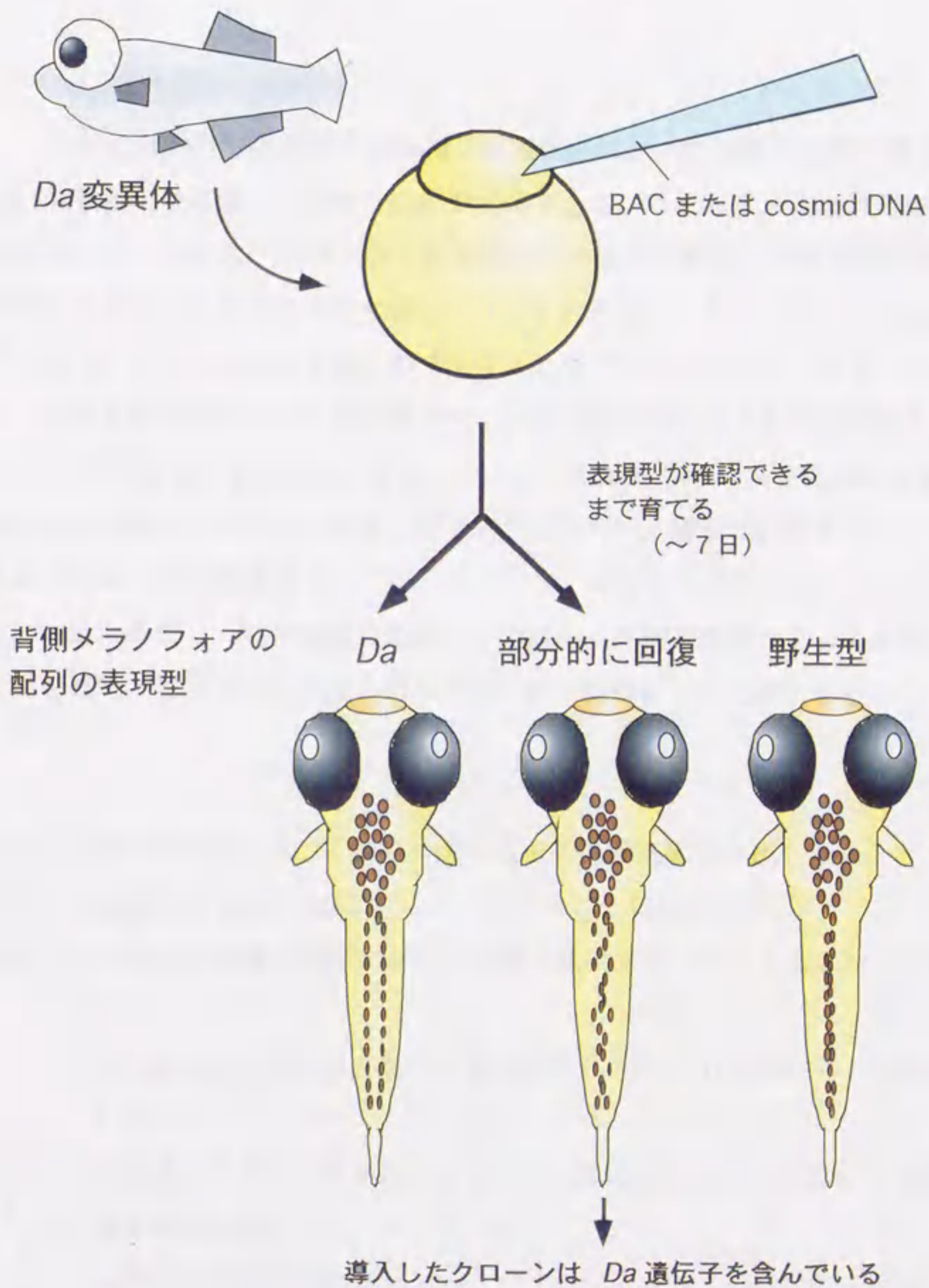


図3-4 BAC、コスミドクローンの導入による表現型レスキュー

BACクローンを導入することによって、表現型が回復するか否かを調べ、*Da*遺伝子が存在することを明らかにする。また、コスミドクローンを導入して同様に調べ、*Da*遺伝子領域をさらに絞り込む。実際には次のように行う。*Da*変異体の受精卵にBACもしくはコスミドクローンをインジェクションする。一番最初に現れる表現型である背側メラノフォアの配列を観察することによって、部分的に表現型が回復したか否かを調べる。表現型は受精後3日目から現れ (Tamiya *et al.* 1997)、孵化時 (受精後約7日目) には明らかである。トランジェントレスキューとして行う予定である。



## まとめ

メダカ自然発生突然変異体*Da*は、体軸後部において背側が腹側の鏡像対称を示す、脊椎動物で非常に特異的な突然変異体である。これらの表現型は体節完成期頃から現れることから、*Da*変異体では個体発生の途中で胴部、尾部の背腹構造の形成に関与する何らかの遺伝子に変異しているものと考えられる。欧米を中心に研究されており、近年大規模な変異体のスクリーニングが行われたゼブラフィッシュを含め、他の脊椎動物のいずれを検索しても、同じ表現型を示す変異体の報告はなく、*Da*変異体の原因遺伝子の同定が望まれている。これまでに、*Da*変異体の形態的な側面からの解析は行われたが、分子生物学的手法を用いた解析は皆無であった。そこで本研究では、*Da*変異をひきおこした遺伝子を、ポジショナルクローニングの手法を用いて直接単離し、発生過程におけるその機能、役割を解析することを目的として研究を進めた。以下に、今回の研究で得られた結果についてまとめる。

- 1) 雌の組換えに基づく新規メダカ遺伝的連鎖地図を作成した。
- 2) *Da*遺伝子をLG VIIIにマッピングすることに成功した。
- 3) *Da*遺伝子近傍の領域においては雄の組換え率が雌よりも高いことが分かった。
- 4) 染色体歩行の開始点となりうる2個のマーカー (stsM02-5、stsB07-3) を得た。
- 5) 既知遺伝子をマップすることにより、進化的に保存されている染色体領域を4箇所同定した。
- 6) *Da*遺伝子近傍の染色体領域が、ゼブラフィッシュのLG 7、ヒトのChr 7に対応する（シンテニックである）可能性が示唆され、ゼブラフィッシュの相同領域から、*vn-cad*, *tbx6*などの遺伝子が*Da*遺伝子の候補として考えられた。
- 7) コスミドベクターを用いてメダカゲノムライブラリーを作成した。
- 8) コスミドライブラリーを384穴プレート320枚（メダカハプロイドゲノムを6回カバー）に植え継ぎ、整列化した。



- 9) 整列化コスミドライブラリーの、PCR法を利用したスクリーニングの系を確立した。
- 10) BACライブラリーとコスミドライブラリーを利用して上記マーカー (stsM02-5、stsB07-3) から染色体歩行を行い、*Da*遺伝子近傍の領域のコンティグマップを完成させた。
- 11) 組換えバッククロス個体を使用して、*Da*遺伝子を含む最小領域を決定した。

以上1～6 (Ohtsuka *et al.* 1999)、7～9 (Ohtsuka *et al.* 投稿準備中)

メダカでは、遺伝的連鎖地図やゲノムライブラリーなどのポジショナルクローニングやゲノム解析を行う上で必須となるリソースが整備されていなかったこともあり、現時点においては*Da*遺伝子の同定に至っていない。しかし今回、原因遺伝子座位の同定、その領域のゲノムDNAのクローン化という、ポジショナルクローニングを行う上でやらなくてはならない3つのステップ(図1-2)の内の2つを完了させた。次に、目的の遺伝子の探索、同定という3つ目のステップを行うことになるが、これまでのステップとは異なり、大規模塩基配列決定法などの手順も整備されており、リソース作成などに時間を費やすこともないため、原因遺伝子の同定は目前であると言える。

今回は、発生過程における詳細な解析は行っていないため、表現型についての新しい記載はない。*Da*変異体の表現型を目にした時に最も興味を惹かれることは、変異体というにはあまりにも秩序だった美しい鏡像対象の表現型が、如何にして形作られていくのかと言うところにある。これは、原因遺伝子が単離されることにより、少しずつ明らかになっていくだろう。また、*Da*遺伝子を同定することにより、脊椎動物の背腹構造の形成機構について新しい側面が見えてくるかもしれない。

本研究では、*Da*遺伝子へアプローチしていく上で、遺伝子地図やゲノムライブラリーなど、様々なリソースを整備した。これは、*Da*遺伝子の単離という本来の目的の他にも、様々な点において利用価値の高いものである。例えば、整列化されたコスミドライブラリーは、他の広範囲の研究に利用可能である。遺伝子地図も様々な解析の基盤となるものであり、遺伝子をさらにマップすることによって、今回いくつかの領域で解析したように、他生物種との比較が可能になる。それによって、



ゲノム進化の問題にも肉薄できると考えられる。このような点からも、本研究は、形態形成機構の研究だけでなく、古くから日本で扱われているメダカを用いたゲノム解析という点での先駆け的なものとなり、進化を含めた他の様々な分野に関しても、飛躍的な発展をもたらすことと自負している。



## 謝辞

貴重なマッピング個体のDNAサンプルを分与して頂き、地図の対応付けの作業の一部を行ってくださった、東京大学理学部動物学教室の三谷啓志先生、成瀬清先生にお礼申し上げます。また、BACライブラリーのコロニーフィルターと、BACクローンを送っていただきました、名古屋大学理学部の堀寛教授、松田勝博士に深くお礼申し上げます。メダカ個体を譲っていただきました、名古屋大学生物分子応答センターの若松佑子先生、新潟大学理学部の酒泉満先生、信州大学理学部の柴田直樹先生と、*wnt8like* primerを譲ってくださった名古屋大学理学部の横井勇人氏に感謝致します。研究を進めて行く上で、適切な指示を頂きました、東海大学医学部の田宮元博士、田中正史先生と名古屋大学生物分子応答センターの依田欣也先生、マッピングの一部を行っていただきました、東海大学医学部の牧野悟士氏、及びFISH実験をしていただきました同医学部の野上正弘博士に深くお礼申し上げます。また、実験上の方法についてアドバイスをいただきました、東海大学医学部の椎名隆博士、吉川枝里さん、岩田京子さん、大腸菌コロニーのピックアップを手伝っていただきました、東海大学医学部の菊池イアーラ幸江博士、松坂恭成君、その他医学部の学生さんにお礼申し上げます。

この研究を行うにあたり、常に適切な御指示と御指導を賜りました東海大学医学部の木村稷教授、ならびに猪子英俊教授に深く感謝致します。また、最後になりましたが、東海大学を御紹介して下さり、様々な面で本研究をサポートして下さいました名古屋大学生物分子応答センターの尾里建二郎教授に深くお礼申し上げます。



## 引用文献

- Aida, T. 1921 On the inheritance of color in a fresh-water fish, *Aplocheilichthys latipes* temmick and schlegel, with special reference to sex-linked inheritance. *Genetics* 6: 554-573.
- Amemiya, C.T., T.P. Zhong, G.A. Silverman, M.C. Fishman, and L.I. Zon. 1999. Zebrafish YAC, BAC, and PAC genomic libraries. *Methods Cell Biol* 60: 235-258.
- Amemiya, C.T. and L.I. Zon. 1999. Generation of a zebrafish P1 artificial chromosome library. *Genomics* 58: 211-213.
- Asakawa, S., I. Abe, Y. Kudoh, N. Kishi, Y. Wang, R. Kubota, J. Kudoh, K. Kawasaki, S. Minoshima, and N. Shimizu. 1997. Human BAC library: construction and rapid screening. *Gene* 191: 69-79.
- Bender, W., P. Spierer, and D.S. Hogness. 1983. Chromosomal walking and jumping to isolate DNA from the *Ace* and *rosy* loci and the *bithorax* complex in *Drosophila melanogaster*. *J Mol Biol* 168: 17-33.
- Black, W.C.t. 1993. PCR with arbitrary primers: approach with care. *Insect Mol Biol* 2: 1-6.
- Botstein, D., R.L. White, M. Skolnick, and R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32: 314-331.
- Burke, D.T., G.F. Carle, and M.V. Olson. 1987. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science*



236: 806-812.

Chakravarti, A., L.K. Lasher, and J.E. Reefer. 1991. A maximum likelihood method for estimating genome length using genetic linkage data. *Genetics* 128: 175-182.

Chumakov, I., P. Rigault, S. Guillou, P. Ougen, A. Billaut, G. Guasconi, P. Gervy, I. LeGall, P. Soularue, L. Grinas, and *et al.* 1992. Continuum of overlapping clones spanning the entire human chromosome 21q [see comments]. *Nature* 359: 380-387.

Clarke, L. and J. Carbon. 1976. A colony bank containing synthetic Col El hybrid plasmids representative of the entire *E. coli* genome. *Cell* 9: 91-99.

Collins, J. and B. Hohn. 1978. Cosmids: a type of plasmid gene-cloning vector that is packageable in vitro in bacteriophage lambda heads. *Proc Natl Acad Sci U S A* 75: 4242-4246.

Collins, F.S., M.S. Guyer, and A. Charkravarti. 1997. Variations on a theme: cataloging human DNA sequence variation. *Science* 278: 1580-1581.

Coulson, A., R. Waterston, J. Kiff, J. Sulston, and Y. Kohara. 1988. Genome linking with yeast artificial chromosomes. *Nature* 335: 184-186.

Daga, R.R., G. Thode, and A. Amores. 1996. Chromosome complement, C-banding, Ag-NOR and replication banding in the zebrafish *Danio rerio*. *Chromosome Res* 4: 29-32.

Dale, L., G. Howes, B.M. Price, and J.C. Smith. 1992. Bone morphogenetic protein 4: a ventralizing factor in early *Xenopus* development. *Development* 115: 573-585.



- Davisson, M.T., & Roderick, T.H. 1981. Recombination percentages. In *Genetic Variants and Strains of the Laboratory Mouse*, M.C. Green, ed. (Stuttgart: Gustav Fisher Verlag).
- Devos, K. M., & Gale, M. D. 1992. The use of random amplified polymorphic DNA markers in wheat. *Theor Appl Genet* 84: 567-572.
- Dib, C., S. Faure, C. Fizames, D. Samson, N. Drouot, A. Vignal, P. Millasseau, S. Marc, J. Hazan, E. Seboun, M. Lathrop, G. Gyapay, J. Morissette, and J. Weissenbach. 1996. A comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites [see comments]. *Nature* 380: 152-154.
- Dietz, H.C., G.R. Cutting, R.E. Pyeritz, C.L. Maslen, L.Y. Sakai, G.M. Corson, E.G. Puffenberger, A. Hamosh, E.J. Nanthakumar, S.M. Curristin, and *et al.* 1991. Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene [see comments]. *Nature* 352: 337-339.
- Donis-Keller, H., P. Green, C. Helms, S. Cartinhour, B. Weiffenbach, K. Stephens, T.P. Keith, D.W. Bowden, D.R. Smith, E.S. Lander, and *et al.* 1987. A genetic linkage map of the human genome. *Cell* 51: 319-337.
- Driever, W., L. Solnica-Krezel, A.F. Schier, S.C. Neuhauss, J. Malicki, D.L. Stemple, D.Y. Stainier, F. Zwartkruis, S. Abdelilah, Z. Rangini, J. Belak, and C. Boggs. 1996. A genetic screen for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* 123: 37-46.
- Ekker, M. 1999. Saving zebrafish mutants. *Bioessays* 21: 94-98.
- Evans, G.A., K. Lewis, and B.E. Rothenberg. 1989. High efficiency vectors for cosmid microcloning and genomic analysis. *Gene* 79: 9-20.



Franklin, J.I. and T.D. Sargent. 1996. Ventral neural cadherin, a novel cadherin expressed in a subset of neural tissues in the zebrafish embryo. *Dev Dyn* 206: 121-130.

Gates, M.A., L. Kim, E.S. Egan, T. Cardozo, H.I. Sirotkin, S.T. Dougan, D. Lashkari, R. Abagyan, A.F. Schier, and W.S. Talbot. 1999. A genetic linkage map for zebrafish: comparative analysis and localization of genes and expressed sequences. *Genome Res* 9: 334-347.

Griffin, K.J., S.L. Amacher, C.B. Kimmel, and D. Kimelman. 1998. Molecular identification of spadetail: regulation of zebrafish trunk and tail mesoderm formation by T-box genes. *Development* 125: 3379-3388.

Haffter, P., M. Granato, M. Brand, M.C. Mullins, M. Hammerschmidt, D.A. Kane, J. Odenthal, F.J. van Eeden, Y.J. Jiang, C.P. Heisenberg, R.N. Kelsh, M. Furutani-Seiki, E. Vogelsang, D. Beuchle, U. Schach, C. Fabian, and C. Nusslein-Volhard. 1996. The identification of genes with unique and essential functions in the development of the zebrafish, *Danio rerio*. *Development* 123: 1-36.

Haldane, J.B.S., A.D. Sprunt, and N.M. Haldane. 1915. Reduplication in mice. *Science* 5: 133-135.

Haldane, J.B.S. 1922. Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. *Journ. of Gen.* 12: 101-109.

Hammerschmidt, M., F. Pelegri, M.C. Mullins, D.A. Kane, F.J. van Eeden, M. Granato, M. Brand, M. Furutani-Seiki, P. Haffter, C.P. Heisenberg, Y.J. Jiang, R.N. Kelsh, J. Odenthal, R.M. Warga, and C. Nusslein-Volhard. 1996. *dino* and *mercedes*, two genes regulating dorsal development in the zebrafish embryo.



Development 123: 95-102.

Heiskanen, M., L. Peltonen, and A. Palotif. 1996. Visual mapping by high resolution FISH. *Trends Genet* 12: 379-382.

Hemmati-Brivanlou, A., O.G. Kelly, and D.A. Melton. 1994. Follistatin, an antagonist of activin, is expressed in the Spemann organizer and displays direct neuralizing activity. *Cell* 77: 283-295.

Hug, B., V. Walter, and D.J. Grunwald. 1997. *tbx6*, a Brachyury-related gene expressed by ventral mesendodermal precursors in the zebrafish embryo. *Dev Biol* 183: 61-73.

Hughes, A.L. and M. Yeager. 1997. Comparative evolutionary rates of introns and exons in murine rodents [published erratum appears in *J Mol Evol* 1998 Apr;46(4):497] [see comments]. *J Mol Evol* 45: 125-130.

Hulbert, S.H., T.W. Ilott, E.J. Legg, S.E. Lincoln, E.S. Lander, and R.W. Michelmore. 1988. Genetic analysis of the fungus, *Bremia lactucae*, using restriction fragment length polymorphisms. *Genetics* 120: 947-958.

Hyodo-Taguchi, Y. and M. Sakaizumi. 1993. List of inbred strains of the medaka, *Oryzias latipes*, maintained in the Division of Biology, National Institute of Radiological Sciences. *Fish Biol. J. MEDAKA* 5: 29-30.

Ioannou, P.A., C.T. Amemiya, J. Garnes, P.M. Kroisel, H. Shizuya, C. Chen, M.A. Batzer, and P.J. de Jong. 1994. A new bacteriophage P1-derived vector for the propagation of large human DNA fragments. *Nat Genet* 6: 84-89.

Iriki, S. 1932. Preliminary note on the chromosomes of pisces: I. *Aplocheilus latipes* and *Lebistes reticulatus*. *Proc. Imp. Acad. Jpn.* 8: 262-263.



- Ishikawa, Y. 1990. Development of caudal structures of a morphogenetic mutant (*Da*) in the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *J. Morphol.* 205: 219-232.
- Ishikawa, Y. Medakafish as a model system for vertebrate developmental genetics. *BioEssays* (in press).
- Janke, A., G. Feldmaier-Fuchs, W.K. Thomas, A. von Haeseler, and S. Paabo. 1994. The marsupial mitochondrial genome and the evolution of placental mammals. *Genetics* 137: 243-256.
- Johnson, S.L., M.A. Gates, M. Johnson, W.S. Talbot, S. Horne, K. Baik, S. Rude, J.R. Wong, and J.H. Postlethwait. 1996. Centromere-linkage analysis and consolidation of the zebrafish genetic map. *Genetics* 142: 1277-1288.
- Jones, C.M., K.M. Lyons, P.M. Lapan, C.V. Wright, and B.L. Hogan. 1992. DVR-4 (bone morphogenetic protein-4) as a posterior-ventralizing factor in *Xenopus* mesoderm induction. *Development* 115: 639-647.
- Kerem, B., J.M. Rommens, J.A. Buchanan, D. Markiewicz, T.K. Cox, A. Chakravarti, M. Buchwald, and L.C. Tsui. 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245: 1073-1080.
- Kim, U.J., B.W. Birren, T. Slepak, V. Mancino, C. Boysen, H.L. Kang, M.I. Simon, and H. Shizuya. 1996. Construction and characterization of a human bacterial artificial chromosome library. *Genomics* 34: 213-218.
- Knapik, E.W., A. Goodman, M. Ekker, M. Chevrette, J. Delgado, S. Neuhaus, N. Shimoda, W. Driever, M.C. Fishman, and H.J. Jacob. 1998. A microsatellite genetic linkage map for zebrafish (*Danio rerio*) [see comments]. *Nat Genet* 18:



338-343.

Koenig, M., E.P. Hoffman, C.J. Bertelson, A.P. Monaco, C. Feener, and L.M. Kunkel. 1987. Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell* 50: 509-517.

Kohara, Y., K. Akiyama, and K. Isono. 1987. The physical map of the whole *E. coli* chromosome: application of a new strategy for rapid analysis and sorting of a large genomic library. *Cell* 50: 495-508.

Koop, B.F. and J.H. Nadeau. 1996. Pufferfish and new paradigm for comparative genome analysis [comment]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 1363-1365.

Kouprina, N., M. Eldarov, R. Moyzis, M. Resnick, and V. Larionov. 1994. A model system to assess the integrity of mammalian YACs during transformation and propagation in yeast. *Genomics* 21: 7-17.

Kruglyak, L. 1997. The use of a genetic map of biallelic markers in linkage studies. *Nat Genet* 17: 21-24.

Kurooka, H., J.A. Segre, Y. Hirano, J.L. Nemhauser, H. Nishimura, K. Yoneda, E.S. Lander, and T. Honjo. 1996. Rescue of the hairless phenotype in nude mice by transgenic insertion of the wild-type *Hfh11* genomic locus. *Int Immunol* 8: 961-966.

Lander, E.S. and P. Green. 1987. Construction of multilocus genetic linkage maps in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 2363-2367.

Lander, E.S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M.J. Daly, S.E. Lincoln, and



L. Newburg. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.

Larionov, V., N. Kouprina, N. Nikolaishvili, and M.A. Resnick. 1994. Recombination during transformation as a source of chimeric mammalian artificial chromosomes in yeast (YACs). *Nucleic Acids Res* 22: 4154-4162.

Lincoln, S.E. and E.S. Lander. 1992. Systematic detection of errors in genetic linkage data. *Genomics* 14: 604-610.

Lovett, M. 1994. Fishing for complements: finding genes by direct selection. *Trends Genet* 10: 352-357.

Lyons, L.A., T.F. Laughlin, N.G. Copeland, N.A. Jenkins, J.E. Womack, and S.J. O'Brien. 1997. Comparative anchor tagged sequences (CATS) for integrative mapping of mammalian genomes [see comments]. *Nat Genet* 15: 47-56.

Monaco, A.P. and Z. Larin. 1994. YACs, BACs, PACs and MACs: artificial chromosomes as research tools. *Trends Biotechnol* 12: 280-286.

Morgan, T.H. 1914. No crossing over in the male of *Drosophila* of genes in the second and third pair of chromosomes. *Biol. Bull.* 26: 195-204.

Mullins, M.C., M. Hammerschmidt, D.A. Kane, J. Odenthal, M. Brand, F.J. van Eeden, M. Furutani-Seiki, M. Granato, P. Haffter, C.P. Heisenberg, Y.J. Jiang, R.N. Kelsh, and C. Nusslein-Volhard. 1996. Genes establishing dorsoventral pattern formation in the zebrafish embryo: the ventral specifying genes. *Development* 123: 81-93.



- Nakamura, Y., M. Leppert, P. O'Connell, R. Wolff, T. Holm, M. Culver, C. Martin, E. Fujimoto, M. Hoff, E. Kumlin, and *et al.* 1987. Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. *Science* 235: 1616-1622.
- Namikawa-Yamada, C., K. Naruse, H. Wada, A. Shima, N. Kuroda, M. Nonaka, and M. Sasaki. 1997. Genetic linkage between the LMP2 and LMP7 genes in the medaka fish, a teleost. *Immunogenetics* 46: 431-433.
- Naruse, K., A. Shimada, and A. Shima. 1988. Gene-centromere mapping for 5 visible mutant loci in multiple recessive tester stock of the medaka (*Oryzias latipes*). *Zool. Sci.* 5: 489-492.
- Naruse, K. and A. Shima. 1989. Linkage relationships of gene loci in the Medaka, *Oryzias latipes* (Pisces: Oryziatidae), determined by backcrosses and gynogenesis. *Biochem Genet* 27: 183-198.
- Nehls, M., D. Pfeifer, M. Schorpp, H. Hedrich, and T. Boehm. 1994. New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature* 372: 103-107.
- Niikawa, N. 1996. [Positional cloning of the putative gene responsible for transient abnormal myelopoiesis and that for multiple cartilaginous exostoses]. *Rinsho Byori* 44: 13-18.
- Nizetic, D., S. Monard, B. Young, F. Cotter, G. Zehetner, and H. Lehrach. 1994. Construction of cosmid libraries from flow-sorted human chromosomes 1, 6, 7, 11, 13, and 18 for reference library resources. *Mamm Genome* 5: 801-802.
- Nizetic, D., G. Zehetner, A.P. Monaco, L. Gellen, B.D. Young, and H. Lehrach.



1991. Construction, arraying, and high-density screening of large insert libraries of human chromosomes X and 21: their potential use as reference libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 3233-3237.

Ohtsuka, M., S. Makino, K. Yoda, H. Wada, K. Naruse, H. Mitani, A. Shima, K. Ozato, M. Kimura, and H. Inoko. 1999. Construction of a Linkage Map of the Medaka (*Oryzias latipes*) and Mapping of the Da Mutant Locus Defective in Dorsoventral Patterning. *Genome Res* 9: 1277-1287.

Olson, M., L. Hood, C. Cantor, and D. Botstein. 1989. A common language for physical mapping of the human genome [see comments]. *Science* 245: 1434-1435.

Ozato, K. and Y. Wakamatsu. 1994. Developmental genetics of medaka. *Develop. Growth & Differ.* 36: 437-443.

Pierce, J.C., B. Sauer, and N. Sternberg. 1992. A positive selection vector for cloning high molecular weight DNA by the bacteriophage P1 system: improved cloning efficacy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 2056-2060.

Postlethwait, J.H., S.L. Johnson, C.N. Midson, W.S. Talbot, M. Gates, E.W. Ballinger, D. Africa, R. Andrews, T. Carl, J.S. Eisen, and *et al.* 1994. A genetic linkage map for the zebrafish. *Science* 264: 699-703.

Postlethwait, J.H., Y.L. Yan, M.A. Gates, S. Horne, A. Amores, A. Brownlie, A. Donovan, E.S. Egan, A. Force, Z. Gong, C. Goutel, A. Fritz, R. Kelsh, E. Knapik, E. Liao, B. Paw, D. Ransom, A. Singer, M. Thomson, T.S. Abduljabbar, P. Yelick, D. Beier, J.S. Joly, D. Larhammar, F. Rosa, and *et al.* 1998. Vertebrate genome evolution and the zebrafish gene map [see comments] [published erratum appears in *Nat Genet* 1998 Jul;19(3):303]. *Nat Genet* 18: 345-349.



- Riedy, M. F., Hamilton, W. J. , & Aquadro, C. F. 1991. Excess of non-parental bands in offspring from known primate pedigrees assayed using RAPD PCR. *Nucleic Acids Research* 20: 918.
- Riordan, J.R., J.M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J.L. Chou, and *et al.* 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA [published erratum appears in *Science* 1989 Sep 29;245(4925):1437]. *Science* 245: 1066-1073.
- Rommens, J.M., M.C. Iannuzzi, B. Kerem, M.L. Drumm, G. Melmer, M. Dean, R. Rozmahel, J.L. Cole, D. Kennedy, N. Hidaka, and *et al.* 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 245: 1059-1065.
- Ruvinsky, I., L.M. Silver, and R.K. Ho. 1998. Characterization of the zebrafish *tbx16* gene and evolution of the vertebrate T-box family. *Dev Genes Evol* 208: 94-99.
- Sakaizumi, M., K. Moriwaki, and N. Egami. 1983. Allozymic variation and regional differentiation in wild populations of the fish *Oryzias latipes*. *Copeia*. 2: 311-318.
- Sasai, Y., B. Lu, H. Steinbeisser, D. Geissert, L.K. Gont, and E.M. De Robertis. 1994. *Xenopus* chordin: a novel dorsalizing factor activated by organizer-specific homeobox genes. *Cell* 79: 779-790.
- Schwartz, D.C. and C.R. Cantor. 1984. Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* 37: 67-75.
- Shepherd, N.S., B.D. Pfrogner, J.N. Coulby, S.L. Ackerman, G. Vaidyanathan,



R.H. Sauer, T.C. Balkenhol, and N. Sternberg. 1994. Preparation and screening of an arrayed human genomic library generated with the P1 cloning system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 2629-2633.

Shimoda, N., E.W. Knapik, J. Ziniti, C. Sim, E. Yamada, S. Kaplan, D. Jackson, F. de Sauvage, H. Jacob, and M.C. Fishman. 1999. Zebrafish genetic map with 2000 microsatellite markers. *Genomics* 58: 219-232.

Shizuya, H., B. Birren, U.J. Kim, V. Mancino, T. Slepak, Y. Tachiiri, and M. Simon. 1992. Cloning and stable maintenance of 300-kilobase-pair fragments of human DNA in *Escherichia coli* using an F-factor-based vector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89: 8794-8797.

Smith, W.C. and R.M. Harland. 1992. Expression cloning of *noggin*, a new dorsalizing factor localized to the Spemann organizer in *Xenopus* embryos. *Cell* 70: 829-840.

Sternberg, N. 1990. Bacteriophage P1 cloning system for the isolation, amplification, and recovery of DNA fragments as large as 100 kilobase pairs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 103-107.

Sturtevant, A. H. 1913. The linear arrangement of sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *Journal of Experimental Zoology* 14: 43-59.

Takeuchi, K. 1966. 'Wavy-fused' mutants in the Medaka, *Oryzias latipes*. *Nature* 211: 866-867.

Talbot, W.S., B. Trevarrow, M.E. Halpern, A.E. Melby, G. Farr, J.H. Postlethwait, T. Jowett, C.B. Kimmel, and D. Kimmel. 1995. A homeobox gene essential for zebrafish notochord development. *Nature* 378: 150-157.



- Tamiya, G., Y. Wakamatsu, and K. Ozato. 1997. An embryological study of ventralization of dorsal structures in the tail of medaka (*Oryzias latipes*) Damutants. *Dev Growth Differ* 39: 531-538.
- Tanaka, M., S. Fukada, M. Matsuyama, and Y. Nagahama. 1995. Structure and promoter analysis of the cytochrome P-450 aromatase gene of the teleost fish, medaka (*Oryzias latipes*). *J Biochem (Tokyo)* 117: 719-725.
- Tomita, H. 1969. On the new mutants in body color and fins of the medaka. *Zool. Mag.* 78: 58.
- Tomita, H. 1975. Mutant genes in the medaka. In *Medaka (Killifish), Biology and Strains* (ed. T. Yamamoto), pp. 251-272. Keigaku, Tokyo.
- Tomita, H. 1992. The lists of the mutants and strains of the medaka, common gambusia, silver crucian carp, goldfish, and golden venus fish maintained in the Laboratory of Freshwater Fish Stocks, Nagoya University. *Fish Biol. J. MEDAKA*. 4: 45-47.
- Tomita, H. 1993. A study on the mutant pectral-finless, pl, of the medaka, *Oryzias latipes*. *Fish Biol. J. MEDAKA*. 5: 31.
- Uwa, H. and A. Iwata. 1981. Karyotype and cellular DNA content of *Oryzias javanicus* (Oryziatidae, Pisces). *Chrom. Inf. Serv.* 31: 24-26.
- Uwa, H. and Y. Ojima. 1981. Detailed and banding karyotype analyses of the medaka, *Oryzias latipes* in cultured cells. *Proc. Japan Acad.* 57: 39-43.
- Verkerk, A.J., M. Pieretti, J.S. Sutcliffe, Y.H. Fu, D.P. Kuhl, A. Pizzuti, O. Reiner, S. Richards, M.F. Victoria, F.P. Zhang, and *et al.* 1991. Identification of



a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 65: 905-914.

Wada, H., K. Naruse, A. Shimada, and A. Shima. 1995. Genetic linkage map of a fish, the Japanese medaka *Oryzias latipes* [published erratum appears in *Mol Mar Biol Biotechnol* 1996 Sep;5(3):239]. *Mol Mar Biol Biotechnol* 4: 269-274.

Weber, J.L. and P.E. May. 1989. A abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44: 388-396.

Weissenbach, J. 1993. Microsatellite polymorphisms and the genetic linkage map of the human genome. *Curr Opin Genet Dev* 3: 414-417.

Welsh, J. and M. McClelland. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res* 18: 7213-7218.

Williams, J.G., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18: 6531-6535.

Woo, S.S., J. Jiang, B.S. Gill, A.H. Paterson, and R.A. Wing. 1994. Construction and characterization of a bacterial artificial chromosome library of *Sorghum bicolor*. *Nucleic Acids Res* 22: 4922-4931.

Yamamoto, A., S.L. Amacher, S.H. Kim, D. Geissert, C.B. Kimmel, and E.M. De Robertis. 1998. Zebrafish paraxial protocadherin is a downstream target of spadetail involved in morphogenesis of gastrula mesoderm. *Development* 125: 3389-3397.

Yan, Y.L., W.S. Talbot, E.S. Egan, and J.H. Postlethwait. 1998. Mutant rescue



by BAC clone injection in zebrafish. *Genomics* 50: 287-289.

Young, W.P., P.A. Wheeler, V.H. Coryell, P. Keim, and G.H. Thorgaard. 1998. A detailed linkage map of rainbow trout produced using doubled haploids. *Genetics* 148: 839-850.

Zhang, J., W.S. Talbot, and A.F. Schier. 1998. Positional cloning identifies zebrafish one-eyed pinhead as a permissive EGF-related ligand required during gastrulation. *Cell* 92: 241-251.

Zhong, T.P., K. Kaphingst, U. Akella, M. Haldi, E.S. Lander, and M.C. Fishman. 1998. Zebrafish Genomic Library in Yeast Artificial Chromosomes. *Genomics* 48: 136-138.

Zon, L.I. 1999. Zebrafish: a new model for human disease [comment]. *Genome Res* 9: 99-100.



Construction of a Linkage Map of the Medaka (*Oryzias latipes*) and Mapping of the *Da* Mutant Locus Defective in Dorsoventral Patterning

Masato Ohtsuka, Satoshi Makino, Kinya Yoda, Hironori Wada, Kiyoshi Naruse, Hiroshi Mitani, Akihiro Shima, Kenjiro Ozato, Minoru Kimura, and Hidetoshi Inoko

**Construction of a Linkage Map of the Medaka (*Oryzias latipes*) and Mapping of the *Da* Mutant Locus Defective in Dorsoventral Patterning**

Genome Res. 1999 9: 1277-1287.









Inches 1 2 3 4 5 6 7 8  
cm 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

# Kodak Color Control Patches

Blue Cyan Green Yellow Red Magenta White 3/Color Black



# Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

