

## 平成22年度学融合推進センター学融合研究事業 成果報告書

研究テーマ名称	ゼブラフィッシュ近交系化系統のゲノム解析
応募事業区分	事業枠③-1「女性研究者研究支援事業」
申請代表者氏名	新屋 みのり

## ○ 研究状況報告

ゼブラフィッシュ野生型系統である India 系統から兄妹交配を繰り返すことにより、世界で初めてのゼブラフィッシュ近交系を作成しようと試みている。本研究開始時点で 16, 17 世代目の交配を行っており、近交系としての定義は満たさないが、実質的には多くの解析で遺伝的背景が均一な集団として用いることが可能な段階に到達したと思われた。そこで本研究においては、解析への適応や分与に先立ち、この近交系化系統のゲノム配列および多型情報を明らかにすることを目的とした。

研究開始時点で安定して継代できていることを確認済みであるペアの内、最も世代が進んだ継代ペアである I14M3、I14F3 の 2 個体 (14 世代目) を解析対象とした。抽出した各個体の DNA から、Paired End Sequencing 用のライブラリー 1 種を作成し、次世代シーケンサー (Illumina Genome Analyzer IIx) により塩基配列決定を行った。得られた配列を、公開されているゼブラフィッシュゲノム配列をリファレンス配列としてマッピングした。現在、IM 継代ペア 2 個体間での多型、およびリファレンス配列と IM 系統間の多型の探索を進めている。

## ○ 当該事業年度において達成された研究成果

I14M3、I14F3 のいずれの個体においても、約 60x の厚みでリファレンス配列の約 95% をカバーするゲノム配列を明らかにできた。未だ解析中ではあるが、IM 系統の 2 個体間には 0.1 ~ 0.5% 程度の多型 (一塩基多型、短い欠失・挿入) がありそうである。現在維持しているすべての IM 系統はこの 2 個体の子孫である。従って、現在 18, 19 世代目の交配を行っているが、これらの個体は 99.5% 以上のゲノム配列が一致しているはずである。このことから IM 系統は遺伝的背景がかなり均一になった集団であると言えよう。また、IM 系統とリファレンス配列との間には 1% 程度の多型があり、種内の多型率としてはメダカ (3.4%) より低い値であるが、高い多型率ではないかと思われる。これらの多型のタイプやゲノム上の位置はすべて明らかであり、こうした多型情報は IM 系統のリソースとしての価値をさらに高めるものである。従って、こうした情報を多くの研究者が容易にアクセスできる環境を整えることが重要だと考えている。

○ 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名等のリスト (論文があれば添付)  
該当無し。

## 平成23年度学融合推進センター学融合研究事業 成果報告書

研究テーマ名称	ゼブラフィッシュ近交系の TILLING ライブラリー作成系の確立
応募事業区分	女性研究者研究支援事業
申請代表者氏名	新屋 みのり

## ○ 研究状況報告

代表者は世界で初めてゼブラフィッシュ近交系の樹立に成功した。本研究では、この近交系である IM 系統を用い、大規模な TILLING ライブラリーを作成するためのシステムを構築することを目的にしている。そのための検討課題として以下の3項目が必要である。

- 1) ENU 処理条件の検討: 近交系にて妥当な変異導入効率を達成できる、化学変異原 ENU の処理条件を見出す。
- 2) オス化の条件検討: ENU 処理や精子凍結に多数のオス個体を要するが、ゼブラフィッシュの性は1遺伝子で決定されず、飼育バッチによって性比が偏りやすい。そこで、効率よくオス個体を得るためのオス化条件を検討する。
- 3) 精子凍結作業の高速化: 多数の凍結が必要となるため、現行手法の2倍程度のスループットを目指す

今年度は、上記3項目の内、1) と 2) について進めた。1) では、生存率から妥当だと考えられる処理条件を固定し、現在この条件における変異導入効率を、high resolution melting (HRM) 法により測定しているところである。2) については、オス化の条件設定を終え、この項目の検討を完了した。

## ○ 当該事業年度において達成された研究成果

## 1) ENU 処理条件の検討

最初に、ゼブラフィッシュにて一般的に用いられている ENU 処理条件にて近交系の処理を行ったところ、生存率が極端に悪いことが明らかとなった。そこで、処理時の水温や ENU 溶液のバッファー組成などの検討を行った。その結果、22℃程度の低温（ゼブラフィッシュの通常の飼育温度は 25～28℃）にて、バッファーには魚類の生理食塩水を用いることにより、20%以下であった生存率を 70～80% と劇的に改善できた。

## 2) オス化の条件検討

雄性化の合成ホルモンであるメチルテストステロンによるオス化を試みた。受精後 10 時間～15 日目の間、100 ng/ml のメチルテストステロン溶液にて IM 系統の胚・稚魚を飼育することにより、100%の個体がオスになることを確認した。

○ 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名等のリスト（論文があれば添付）  
該当無し。

(様式 3)

## 平成 24 年度学融合推進センター学融合研究事業 研究成果報告書

研究テーマ名称	ゼブラフィッシュ近交系の TILLING ライブラリー作成系の確立
応募事業区分	女性研究者研究支援事業
申請代表者氏名	新屋 みのり

## ○ 研究状況報告

代表者は世界で初めてゼブラフィッシュ近交系の樹立に成功した。本研究では、この近交系である IM 系統を用い、大規模な TILLING ライブラリーを作成するためのシステム構築を目的にしている。そのための検討課題として以下の 3 項目が必要であった。

- 1) オス化の条件検討：本システムでは多数のオス個体を要するが、ゼブラフィッシュでは飼育バッチ毎に性比が偏りやすい。そこで効率よくオス個体を得る条件を検討した。
- 2) ENU 処理条件の検討：近交系にて妥当な生残率および変異導入効率を達成できる、化学変異原 ENU の処理条件を見出した。
- 3) 精子凍結作業の高速化：多数の凍結が必要となるため、現行手法の 2 倍程度のスループットがある手法を立ち上げた。

昨年度に 1) を完了し、2) について生残率が格段に改善される条件を見出していた。そこで今年度は見出した ENU 処理条件における変異導入効率を測定し、その妥当性を評価した。また、3) の検討を行い、目標を達成した。

## ○ 当該事業年度において達成された研究成果

## 2) ENU 処理条件の検討

昨年度見出した条件下で IM オス個体を ENU 処理し、これを未処理の IM 系統メスと交配して F<sub>1</sub> を得た。759 個体の F<sub>1</sub> を用いて約 2Mb のゲノム領域を high resolution melting 法により調べたところ、660kb に 1 変異程度の頻度で変異が導入されていることがわかった。この効率は、過去のゼブラフィッシュにおける ENU 変異導入効率と比較しても決して高いとは言えないが、ライブラリーを作成するのに十分なだけの効率である。従って、目的は達成できたと判断した。

## 3) 精子凍結作業の高速化

同じ小型魚類のメダカにて用いられている方法を参考に、現行手法の見直しを行った。現行手法では冷媒として液体窒素を用いている。高い揮発性のため作業途中での液体窒素の補充やそれに伴う冷却待機時間が必要であり、これらが凍結そのものの作業と同程度の所要時間を占めていた。そこで、ドライアイス冷媒に用いる方法を取り入れ、補充や待機時間を無くした。その結果、これまでのスループットが 12 個体/日であるのに対し、改良版では約 35 個体/日程度にまで高速化できた。

## ○ 本研究を基に発表した論文と掲載された雑誌名等のリスト（論文があれば添付）

本年度は該当なし。