

キンギョの多様な表現型と全ゲノム重複 疾患モデル動物としての展開

大森 義裕

Key words : 疾患モデル動物, 全ゲノム重複, 次世代 DNA シーケンサー, 硬骨魚類, 網膜色素変性

キンギョは約 1000 年の育種の歴史のなかで多くの変異体が見いだされてきた。しかし、そのゲノム情報をベースとした包括的な研究は全ゲノム重複という壁に阻まれ、これまで実現されなかった。最近、筆者らはキンギョの全ゲノム配列を報告し、このことにより、変異体の原因遺伝子同定への道が開けた¹⁾。キンギョにはヒト疾患に類似する表現型が見いだされており、進化や発生など基礎生物学的な研究だけでなく基礎医学的な研究にも貢献することが期待される。

I あらためてキンギョとは？

キンギョ (goldfish, *Carassius auratus*) はコイ (common carp, *Cyprinus carpio*) と同じコイ科コイ亜科に属する観賞魚である。キンギョは約 1000 年前の中国、宋の時代に中国南部の野生のフナから赤いヒブナが見いだされたことに由来し、主に東アジアにおいて数百年間にわたって品種改良が進められてきた (図 1)。日本には室町時代に伝来し、江戸時代に盛んに品種改良が行われ、現在、日本では愛知県弥富市や奈良県大和郡山市、東京都江戸川区などの産地を中心に育種が継承されている。キンギョは今や、世界中で飼育されており、デメキンやランチュウ、オランダ、シュブンキンなど 70 種類以上の多様な品種が知られている。キンギョの表現型の多様性は 19 世

紀の Charles Darwin の時代に既に科学的な関心の対象となっており、彼の著書のなかでもこれらに対する興味がつづられている²⁾。

ゼブラフィッシュやメダカなどの小型魚類と比較したとき、キンギョを研究するメリットとしては、キンギョにはメダカやゼブラフィッシュでは見いだされていない表現型が多いことが挙げられる³⁾。肉隆や出目表現型のバリエーション、花房や水泡眼など顔部にみられる特徴、鰭の様々な形態や、鱗の色や形態、配置などがキンギョ独特の表現型である。形態形成や発生学の視点から新たな変異体の解析による分子メカニズムの解明につながる可能性が予想される。

また、キンギョはサイズが比較的大きいため、同一の個体から多量のサンプルを回収することもメリットである。キンギョの個体は 1 kg 以上に成長させることも可能であり、メダカやゼブラフィッシュと比較すると 1,000 倍以上のサイズとなる。これは、同一個体から大量の生体材料を準備できるという点で有利である。シングルセル RNA-seq 解析をはじめとしたシングルセル解析を行う場合に特に有用で、複数個体のバルクのサンプルではなく、同一の個体から大量の細胞を得ることで遺伝学的なバリエーションを最小限に抑えた解析を行うことが可能である。組織の幹細胞など 1 個体から少量しか回収できない細胞種の解

A wide variety of phenotypes and whole genome duplication in goldfish : as a model for human disease

Omori Yoshihiro : 長浜バイオ大学大学院バイオサイエンス研究科 (〒 526-0829 滋賀県長浜市田村町 1266)

0370-9531/02/¥500/ 論文/JCOPY

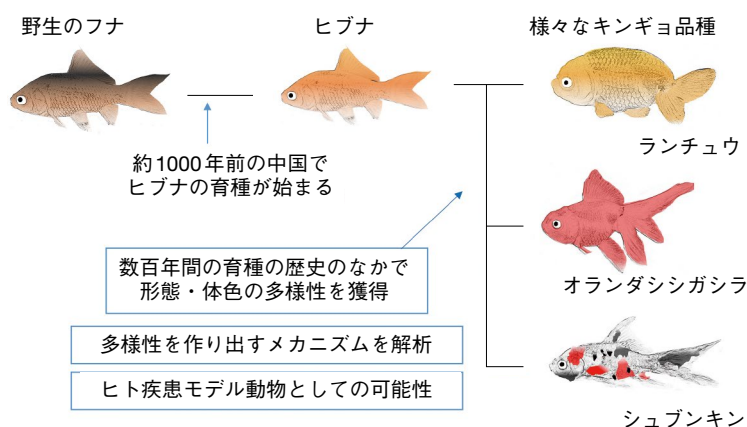


図1 フナからキンギョの育種と品種の改良

約1000年前の中国宋の時代に中国のフナ（日本のフナとは亜種の関係。日本のフナとも交配可能）から赤い色をしたヒブナが突然変異により見いだされ、育種が始まった。その後、数百年をかけて中国、日本を中心としたアジア地域で様々な表現型が発見され、その組み合わせにより多くの品種が生み出された。

析にも同様の理由で適しているといえる。また、個体サイズが大きいことで電気生理学的な実験など微小手術が必要な実験も行いやすい。一方でデメリットとしては、ゼブラフィッシュやメダカと比較するとサイズが大きく飼育場所の確保が必要なことと、世代時間が1-2年程度と長いことため遺伝学的な解析が多少難しいことが挙げられる。それでも、同程度のサイズの魚類（ニジマス、イワナなどの冷水性淡水魚やマダイ、ヒラメなどの海水魚）と比較すると飼育は容易である。

II 多様な変異を示すキンギョ

キンギョを研究する一番の動機としては、その多様な表現型が挙げられる。わざわざ変異体のスクリーニングを行わなくても、ペットショップに行けば少なくとも10種類程度の表現型を容易に見いだすことができる。筆者がキンギョの研究を始めようと思ったのは、米国留学中にゼブラフィッシュを使って眼の発生を研究していたころであった。日本ではお馴染みであるが、米国のペットショップでも販売されているデメキンを見て懐かしい思いだったのだが、これはどういうしくみで出目になるのだろうか？とあらためて不思議に感じたことからであった。

眼が巨大化した出目のほかにも、出目の眼軸を上を向いた頂天眼、頭部に発達したコブである肉

隆を持つオランダシシガシラ、鼻腔に花のような房が出ている花房、眼下に水泡のある水泡眼などがある（図2A）³⁾。また、鰭の表現型としては、野生型のフナ尾（ワキン）に対し、長く伸びた吹き流し尾、体軸が倍加し尾鰭が3枚に割れている三ツ尾、倍加した尾鰭が孔雀のように垂直に開く孔雀尾、蝶のように水平に開く蝶尾、ランチュウのグループにみられる背鰭欠損が挙げられる（図2B）。体色は一般的な赤またはオレンジ色に加え、黒、銀、モザイク状に透明鱗が入ったキャリコ、鱗にドーム状の突起のあるパール鱗、透明な透明鱗、透明鱗の別タイプで網状の模様に見える網透明鱗がある（図2C）。これらキンギョの体色は、黒色素胞、黄色素胞、虹色素胞の3種類の色素胞（色素細胞）の組み合わせで表現されていると考えられている（図2D）。ちなみに、黄から、オレンジ、赤の色は黄色素胞のバリエーションでありエサの組成により変化する。

キンギョ品種の遺伝学的な研究は、古い時代（大正～昭和初期）から松井やChenらによって行われている^{4,5)}。例えば、デメキンの出目表現型は劣性遺伝することが証明されている。また、アルビノは二重変異により劣性遺伝することが明らかにされており、全ゲノム重複を予想させる結果が、1970年代に既に示されていたことは驚きに値する⁶⁾。表現型の原因遺伝子の特定に関して



図 2 キンギョの多様な表現型

A. 眼と頭部にみられる形態の表現型。写真の上部に表現型(黒字)、下部に品種名(青字)を示した。B. 鰭の形態にみられる表現型。C. 体色と鱗にみられる表現型。D. 体色の多様性を生み出す3種の色素胞。(文献3より改変して引用。©日本生化学会・オックスフォード大学出版局)

は、これまでで唯一、三ツ尾の表現型が阿部、太田らにより BMP シグナルの因子であることが報告されたのみである⁷⁾。これは、ゼブラフィッシュの表現型に近い変異体から見いだした候補遺伝子を足掛かりにした解析であるが、今後は、原因遺伝子の予測のつかないような新規な表現型でもゲノム情報を使って解析が可能になると考えられ、急速に多くの表現型と原因遺伝子の関係が明らかにされると予想される。

ここで気をつけなければならないのは、多くの品種は複数の表現型を同時に持っていることである。例えばクロデメキンであれば、黒色、出目、三ツ尾、尾鰭の伸長、体軸の短縮など少なくとも5つの多重変異を持つ品種である。共通の表現型

を持つ複数の品種の解析や、雑種交配により遺伝学的に表現型を分離した個体の解析が有用となるであろう。

Ⅲ 疾患モデルとしてのキンギョ

ゼブラフィッシュやメダカがそうであるように、キンギョもヒトと同じ脊椎動物であり多くの遺伝子が保存されていることから、キンギョ変異体をヒト疾患モデルとして研究できる可能性が考えられる。愛玩動物や家畜として歴史の長い生物は人工的に保護された環境で代々飼育されてきたために、ヒト疾患に類似した表現型を持つことがしばしばみられる。マウスの自然発生突然変異体やイヌの品種から多くのヒト疾患関連遺伝子が同

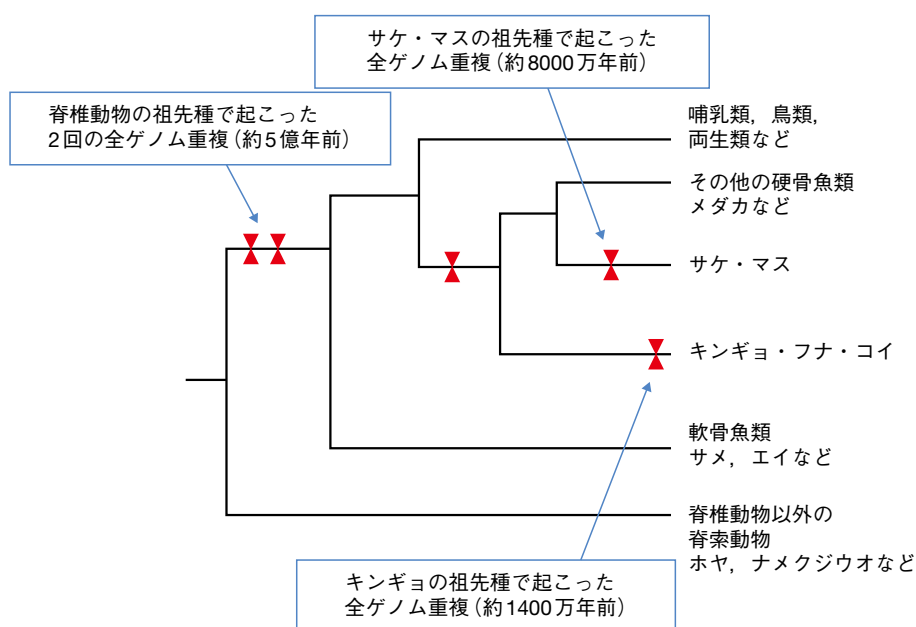


図 3 脊椎動物における全ゲノム重複

約 5 億年前の脊椎動物の祖先種で 2 回の全ゲノム重複が起こったとされている。更に、硬骨魚類では、約 3 億年前に全ゲノム重複が起こったと考えられる。サケ・マス類においては約 8000 万年前に、アフリカツメガエルにおいては約 1800 万年前に、コイ・フナについては約 1400 万年前にそれぞれの祖先種で全ゲノム重複が起こったと考えられる。樹形図のなかで全ゲノム重複が起こったと考えられている箇所を赤三角で示した。

定されたように、観賞魚として歴史のあるキンギョでもヒト疾患関連遺伝子の変異を持つ品種が存在している可能性は高い。実際、眼疾患との関連が報告されているキンギョ品種がある。チョウテンガンは、網膜変性を示すことが報告されており^{8,9)}、網膜電図の解析でも異常を示していることから、チョウテンガンの網膜は機能的にも欠陥があることが報告されている¹⁰⁾。電顕解析の結果、この網膜変性はヒトの網膜色素変性症に類似しており、チョウテンガンを解析することで網膜色素変性症の発症メカニズム解明につながる可能性が考えられる⁹⁾。デメキンの眼球サイズ拡大は進行性であり、眼圧の上昇を伴うという報告がある¹¹⁾。これは、ヒトの緑内障の発症機構と類似しており、デメキンが緑内障の発症メカニズムを解析するためのモデルとして利用できる可能性が考えられる。また、デメキンは眼球サイズの拡大により極度の近視となることが明らかにされており¹²⁾、レンズの焦点距離と眼球サイズの調節を研究するモデルとして有用であると考えられる。リュウキンなどの品種が持つ体軸の短縮は、骨形

成異常を伴う遺伝性疾患と関連がある可能性が考えられる。また、野生のフナは育種されたキンギョと比較すると臆病で過敏であり、キンギョは数百年の育種の歴史のなかで人工飼育されてきたために、内耳などの感覚器や脳に係る遺伝子に有害変異が蓄積した個体が生存し、感覚器や脳の機能に異常を持つ可能性も考えられる。これらの変異体の解析からヒト疾患の新たな発症メカニズムが明らかになることが期待される。

IV 全ゲノム重複とキンギョゲノムの解析

全ゲノム重複とは、生物のゲノム全体が倍化する現象で、同種のゲノムが倍加する同質倍数体と、進化的に近い異種の交雑によって起こる異質倍数体があり、動物だけでなく植物や菌類でもみられる。キンギョでは比較的新しい時代に全ゲノム重複(異質 4 倍体化)が起こったことが知られており、全ゲノム重複後の遺伝子進化の題材としてもキンギョゲノムの研究は興味深い(図 3, 図 4)。

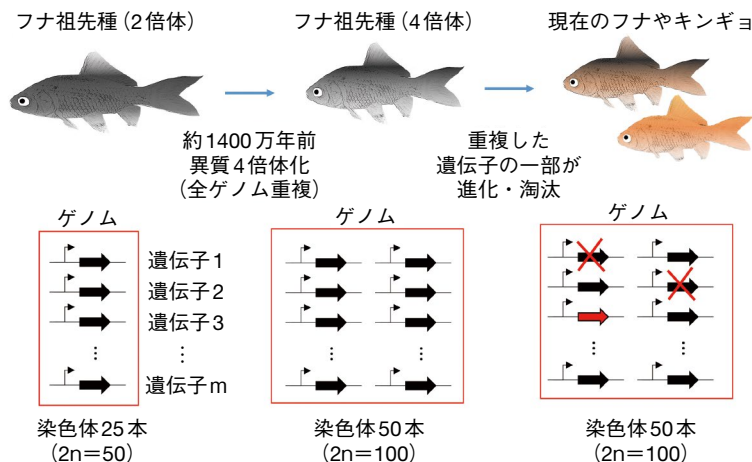


図 4 キンギョ祖先種における全ゲノム重複とその後のゲノムの進化

約 1400 万年前に、キンギョの祖先種で異質 4 倍体化による全ゲノム重複が起こった。その後、時間とともに倍加した遺伝子の片方がゲノムから脱落しシングルトンとなる遺伝子や、発現パターンを変化させた遺伝子 (subfunctionalization)、新機能を獲得した遺伝子 (neofunctionalization) などが出現しゲノムの進化が現在も進んでいる。その様子を観察することで、脊椎動物の祖先種において約 5 億年前に起きたとされる全ゲノム重複の直後にどのようなことが起こったかを考えるうえで貴重な情報となる。

一般に全ゲノム重複が起こると遺伝子数が倍加することで冗長性が高まり、環境に適応する自由度が増す。倍加した遺伝子数は数千万年オーダーの時間をかけて徐々に淘汰されもとの遺伝子数近くに帰ってゆくが、重複した遺伝子の一部は新たな発現パターンを獲得したり (subfunctionalization)、新たな機能を獲得したりする (neofunctionalization) ことでその種の進化に貢献する¹³⁾。脊椎動物の祖先は、約 5 億年前に 2 回の全ゲノム重複を経験したと予想されており、これらの全ゲノム重複後の遺伝子進化が脊椎動物の進化の大きな原動力となっていると考えられている。しかし、この 2 回の全ゲノム重複はあまりに古い時代に起こった現象なので、その後の進化の痕跡が必ずしも明瞭に残っているわけではない。そこで、キンギョのような比較的新しい時代に全ゲノム重複を経験した生物のゲノムを研究することで、約 5 億年前の全ゲノム重複の直後、どのように遺伝子が進化してきたのかを予想することができる。

筆者らがキンギョの研究を開始したのは約 10 年前であるが、キンギョの多様な表現型を制御する遺伝子の機能を明らかにするために、まず全ゲノム塩基配列情報が必要であると考えた。しか

し、当時の技術では、たとえ全ゲノムシーケンスを行っても、このキンギョの祖先種に起こった全ゲノム重複のために、対立遺伝子とオオノログの違いを見分けることが難しく全ゲノムを正確にアセンブルすることが困難であることがわかり断念した。それが可能になったのは、新型のロングリード次世代 DNA シーケンサー (第 3 世代 DNA シーケンサー; Pacific Biosciences 社 PacBio RS II など) が登場したことが大きい。これまでの多くの生物のゲノム配列解析は、一般的なショートリード次世代 DNA シーケンサー (第 2 世代 DNA シーケンサー; イルミナ社 HiSeq シリーズなど) で 100 bp から 200 bp の短い DNA 配列を解析し、これらのショートリードシーケンスをつなぎ合わせアセンブルすることでゲノム配列を決定する方法が行われてきた。しかし、今回用いた PacBio を使うと、一度に 10,000-40,000 bp の DNA 配列を解析できるため、キンギョのような高い冗長性を持つゲノムに対してもよりアセンブルに適したリードを用意することができる。更に筆者らは、ゲノムをアセンブルしやすくするために、雌性発生キンギョを作製し、ゲノム上の多くの対立遺伝子がホモ接合となる個体を使ってゲノム解読を

行った。これらの手法により、全長、約 1.8 Gbp のキンギョ全ゲノム解読に成功し、キンギョの祖先種のゲノムが約 1400 万年前に全ゲノム重複を経験したことや、倍加した遺伝子の一部が進化の過程で淘汰されて 1 コピーを失った遺伝子（シングルトン）となったり、組織のなかでの新たな発現パターンを獲得したりする様子が明らかとなった。この解析から、全ゲノム重複のために倍加した遺伝子の約 12% が淘汰されてゲノムから消失しシングルトンとなったことがわかった。また、2 コピーになった遺伝子（オオノログペア）の約 30% が臓器での発現パターンに変化がみられることがわかった。これらの解析により淘汰されやすい遺伝子や、発現変化を受けやすい遺伝子の顔ぶれがより鮮明になってきた。酸化還元酵素や核酸分解酵素、メチル基転移酵素の活性を持つ遺伝子は早く失われシングルトンとなる傾向が高く、逆にタンパク質結合能や転写因子の機能を持つ遺伝子はオオノログとして保持されやすいことがわかった。

キンギョの遺伝子が失われる速度は 100 万年当たり 0.43% で、キンギョよりも少し古い時代（8000 万年前）に全ゲノム重複が起こったサケ（100 万年当たり 0.25% の消失）と比べて速く¹⁴⁾、キンギョのゲノムが急速に遺伝子を失う進化過程にあることが明らかとなった。比較的新しい時代（1800 万年前）に全ゲノム重複が起こったことが報告されている生物としてアフリカツメガエルが知られているが¹⁵⁾、遺伝子が失われる速度は 100 万年当たり 1.2% とキンギョよりも速かった。サケ・マス類やアフリカツメガエルなど全ゲノム重複を比較的新しい時代に経験している生物は少ないのだが、これらの生物のシングルトンやオオノログをより詳細に比較することで、脊椎動物の進化のなかで幾度か経験した全ゲノム重複の直後にどのような進化が起こるのかをより鮮明に解析することができると期待される。

おわりに

全ゲノム重複直後は 2 セットのゲノムが同じ細胞の核内に収まっていることになるが、それぞれ

のゲノムのセットをサブゲノムと呼ぶ。アフリカツメガエルにおいては、倍加してできた 2 つのサブゲノム中のシングルトンの分布が対称ではなく、片方のサブゲノムのほうが明らかに多いことが発見されている。2 セットあるサブゲノムが非対称に進化しているのである¹⁵⁾。たとえて言うなら 2 つのサブゲノムが平等ではなく、“利き手の違い”のように“使用頻度”に偏りがあるというのである。キンギョにおいても非対称サブゲノム進化が起こっているか否かはこれまでのところ明らかとなっていないが、キンギョに非対称サブゲノム進化が起こっているとすると、進化または淘汰された遺伝子がどのような分布でサブゲノム上に存在するかを解析することで、進化の過程がより鮮明にわかる可能性がある。昭和の時代に松井、山本の両博士が夢見たキンギョの遺伝学的研究の進展がこの令和の時代にどのような展開を見せるのか楽しみである。

●文 献

- 1) Chen Z, Omori Y, Koren S et al: *Sci Adv*. 5:eaav0547, 2019
- 2) Darwin C: *The Variation of Animals and Plants Under Domestication*. Vol. 2, John Murray, London, 1868
- 3) Omori Y, Kon T: *J Biochem*. 165: 209-218, 2019
- 4) 松井佳一: 科学と趣味から見た金魚の研究, 弘道閣, 東京, 1935
- 5) Chen SC: *Genetics*. 13: 434-452, 1928
- 6) Yamamoto TO: *The Japanese Journal of Genetics*. 48: 53-64, 1973
- 7) Abe G, Lee SH, Chang M et al: *Nat Commun*. 5:3360, 2014
- 8) Matsumura M, Ohkuma M, Honda Y: *Ophthalmic Res*. 14: 344-353, 1982
- 9) Matsumura M, Ohkuma M, Honda Y: *Exp Eye Res*. 32: 649-656, 1981
- 10) Sakaue H, Negi A, Matsumura M et al: *Doc Ophthalmol*. 70: 97-101, 1988
- 11) Raymond P, Spilman D, Hill R, Bahn C: *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 25: 282, 1984
- 12) Easter SS Jr, Hitchcock PF: *Vision Res*. 26: 1831-1833, 1986
- 13) Glasauer SM, Neuhauss SC: *Mol Genet Genomics*. 289: 1045-1060, 2014
- 14) Lien S, Koop BF, Sandve SR et al: *Nature*. 533: 200-205, 2016
- 15) Session AM, Uno Y, Kwon T et al: *Nature*. 538: 336-343, 2016