

連載講座

生命科学を拓く新しい実験動物モデル-21

透明魚ダニオネラ

生命科学研究の新たな生体イメージングモデル動物

安藤 康史 菊地 和

Key words : 小型魚類, ダニオネラ, 生体イメージング, ゲノム編集, 遺伝子導入

近年のイメージング技術の発展により, 細胞内の重要な反応を生きたままに分子レベルで観察できるようになってきた。しかし, 一般的なモデル動物として使用されているマウスでは, 皮膚表面に近い部位のイメージングは可能であるものの, 体の深部の臓器や組織のイメージングは現在なお困難である。従来, ゼブラフィッシュやメダカなどの小型魚類が生きた個体のイメージング研究に使用されてきたが, 組織が透明であるのは稚魚のみであり, 成体でのイメージングは難しい。

本稿で取り上げる実験動物モデルは, 近年その高い組織透明性から生体イメージング研究における有用性が注目されているダニオネラ (*Danionella*) である。ダニオネラはウロコがなく皮膚や腹部臓器を覆う膜も完全に透明であるため, ほぼすべての臓器で生きている細胞の機能や病態をオルガネラレベルでイメージングすることが可能な画期的なモデル動物になり得ると期待されている (図 1)。

I ダニオネラの発見

ダニオネラは生命科学研究で一般的に使用されているゼブラフィッシュと同様に, コイ科のダニオ亜科 (Danioninae) に属する小型魚類である。その発見の歴史は以外に古く, 1985 年にミャンマーの首都ヤンゴン (旧ビルマ, ラングーン) の北西およそ 100 km に位置する小川の浅瀬で最初

の個体が採取されている。この小型魚は卵を保持する成体雌魚でも体長が最大 12 mm 程度と, 淡水魚として世界最小の成体サイズを示す種であることがわかり, 全身が透明な新種の小型魚類として *Danionella translucida* と命名され, その形態学的・解剖学的な特徴が詳細に報告された¹⁾。その後, ヒレの鰭条や肋骨などの形態学的な違いやシトクローム遺伝子の配列の違いなどから, *D. translucida* とは異なる新たなダニオネラ種として *D. dracula*, *D. priapus*, *D. mirifica*, *D. cerebrum* が同定されている²⁾。いずれのダニオネラ種も体長が小さく組織透明性が高いという特徴は共通しており, 極めて類似した外見を呈するため, 肉眼的な判別は困難である。また, 外見上の特徴のみならず, 行動様式などもほぼ共通すると考えられており, 本稿では簡略化のため前述の 5 種を区別することなくダニオネラと表記を統一して解説する。なお, 筆者らの研究室では *D. cerebrum* を用いて研究を進めており, 本稿で紹介するダニオネラのデータはすべてこの種を用いて得られたものである。

II ダニオネラの成長・行動の特徴

ダニオネラの成長過程に特徴的な現象として, ネオテニー (neoteny) が知られている。ネオテニーとは繁殖能力を持つ性的に成熟した個体において, 通常幼生や幼体にのみみられる形質が存在

Danionella, an emerging model organism for live imaging research

Ando Koji, Kikuchi Kazu : 国立循環器病研究センター研究所心臓再生制御部 (〒564-8565 大阪府吹田市岸部新町 6-1)

0370-9531/08/¥500/論文/JCOPY

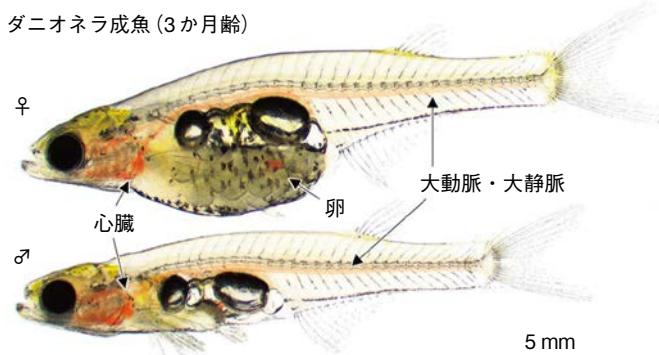


図 1 野生型ダニオネラの成魚

ダニオネラは成魚においても全身が透明であり、生きた個体において心臓、大動脈、大静脈などの体内深部臓器が観察できる。雌魚では腹部に卵が見える。

する現象である。ネオテニーがみられる生物の著名な例として、両生類では変態後消失する鰓が性成熟後も残るメキシコサラマンダー（アホロートル）が挙げられる。ダニオネラの高い透明性や小型化といった特徴は水棲生物の幼生にみられる特徴と共通しており、ネオテニーの 1 例である可能性が考えられる³⁾。また、ダニオネラでは骨格の大部分が完全に骨化しておらず、頭蓋骨も側頭部で止まっており、頭頂部を被覆する骨組織が存在しない。これらは骨格の発達が中断していることを示唆しており、ダニオネラのネオテニーを示すものと考えられている^{1,4,5)}。

ダニオネラの行動様式に特徴的な現象として、性的二形 (sexual dimorphism) が挙げられる。性的二形は生物における多型現象の一つであり、性別によって個体が異なる形質を示す現象である。ダニオネラは、音声コミュニケーションに最も明らかな性的二形を示すことが知られている。ダニオネラの雄同士を同一のタンクで飼育すると、様々な振動数 (60–120 Hz) の音声を発することが知られている⁵⁾。この音声はダニオネラの小ささからは予想ができないほど大きい。筆者らも静寂環境での作業中に鋭利な金属で壁を引っかいたような異音を耳にし、それがダニオネラの飼育タンクから発せられた音声であると感じて驚いたことがあった。同様の発声は雌には全くみられず、この発声現象が生じるタイミングは一日の間に雌と交配するタイミングにほぼ一致すること、発声

頻度が同一タンク内の雄の数を増やすと共に上昇し、雄の攻撃行動と同時に発声が生じるケースがあることなどから、雄同士の闘争行動に関連したコミュニケーションであると考えられている⁵⁾。このような発声を可能とするため、ダニオネラの雄には drumming apparatus と呼ばれる肋骨や浮袋に接する特殊な軟骨が存在し、その動きをコントロールする筋肉も極めて顕著に発達することが知られている⁴⁾。

前述した音声コミュニケーション以外にも、ダニオネラは視覚に依存して群れを形成し協調して泳ぐなど、成長に伴う複雑な行動様式を発達させることができる⁵⁾。ダニオネラではネオテニーの一環として骨格発生が中断するなどの特徴がみられ、これらは成体におけるイメージングに好都合な形質であると考えられる。一方で、前述したような高度に発達した神経機能も持っており、イメージングを用いて生きたまま複雑な成体組織機能を理解する新たな研究での利活用が期待される。

Ⅲ ダニオネラの飼育・給餌・採卵

以降では、ダニオネラを用いた研究を始めるうえで重要となる飼育法、給餌法、採卵法について、現時点で筆者らが最善と考える方法を順に解説する。まず、ダニオネラの飼育法について解説する。基本的にダニオネラもゼブラフィッシュと同様の飼育ラックを使用して飼育することができ



図 2 ダニオネラ成魚の飼育

るが(図 2), 飼育水に若干の変更が必要となる。飼育水の水温(28℃)と pH(7.0-7.05)はゼブラフィッシュと同じであるが, 電気伝導度はゼブラフィッシュ用の 500 μS から 300-350 μS に変更している⁶⁾。筆者らは, ゼブラフィッシュ用の飼育水を用いることによるダニオネラへの影響は確認していないが, ゼブラフィッシュの生存や繁殖に対してダニオネラ用の飼育水による影響がみられないことを確認している。このため, 筆者らの研究室では, 飼育ラックの循環水をダニオネラ用に設定し, ゼブラフィッシュを同じラックで飼育している。

ゼブラフィッシュの稚魚飼育と同様, ダニオネラの稚魚は, ペトリディッシュにメチレンブルーを添加した飼育水を加え, 生後 5 日まで飼育する(図 3)。その後, 幼魚に成長したダニオネラを水深 3-4 cm の飼育水を加えた飼育タンクに移動し, 14 日まで飼育する。筆者らは室温 25-28℃に設定した部屋の一角に幼魚飼育ラックを設置し(図 3), そこに飼育タンクを置いて給餌を継続しつつ, 飼育水を交換せずに 14 日まで飼育する。止水で飼育した場合, 給餌による水質汚染が生存率に最も大きな影響を与えるが, 後述する給餌法を採用することで, 飼育水の汚染を防止してい



図 3 ダニオネラ稚魚・幼魚の飼育

る。14 日以降は成魚と同じ飼育ラックに移動し, タンクへの水流の供給を開始し, 成長に合わせて水流を徐々に強める(図 2)。ゼブラフィッシュと同様に飼育密度が低いと生育が早く, 飼育密度を数匹/L に調整した場合は生後 2 か月ほどで産卵が可能となる。通常は飼育密度を 15 匹/L 以下となるように調整する。

ダニオネラの給餌方法もゼブラフィッシュと共通する部分が多いが, 1 点注意することは幼魚への給餌でワムシを使用することの重要性である。稚魚は卵黄由来の栄養に生後 5 日まで依存するため給餌の必要がなく, 生後 5 日以降の幼魚から 1 日 1 回 14 日まで淡水ワムシとゾウリムシの混合餌を給餌する。ゼブラフィッシュの稚魚はゾウリムシだけで十分であるが, 筆者らの経験ではダニオネラの生存にはワムシの給餌が必須である。ダニオネラはワムシを主食とするが, ゾウリムシを同時に添加することで沈下した残渣が食掃され, 止水タンクの水質悪化を防ぐことができる。飼育規模の拡大と共に飼育水交換には大変な労力を要するが, ワムシとゾウリムシを同時に給餌することでこの部分の労力を削減できる。また, 筆者らの経験では, 粉餌よりもワムシの給餌でダニオネラ幼魚の生存率が高かった。生後 14 日以降はブラインシュリンプを午前中に 1 日 1 回給餌し, 午後に粉餌(Gemma Micro ZF)を 1 日 1 回給餌する。ダニオネラは沈下した餌を捕食しない傾向があるため, 給餌量の調整が必要である場合は 1 回

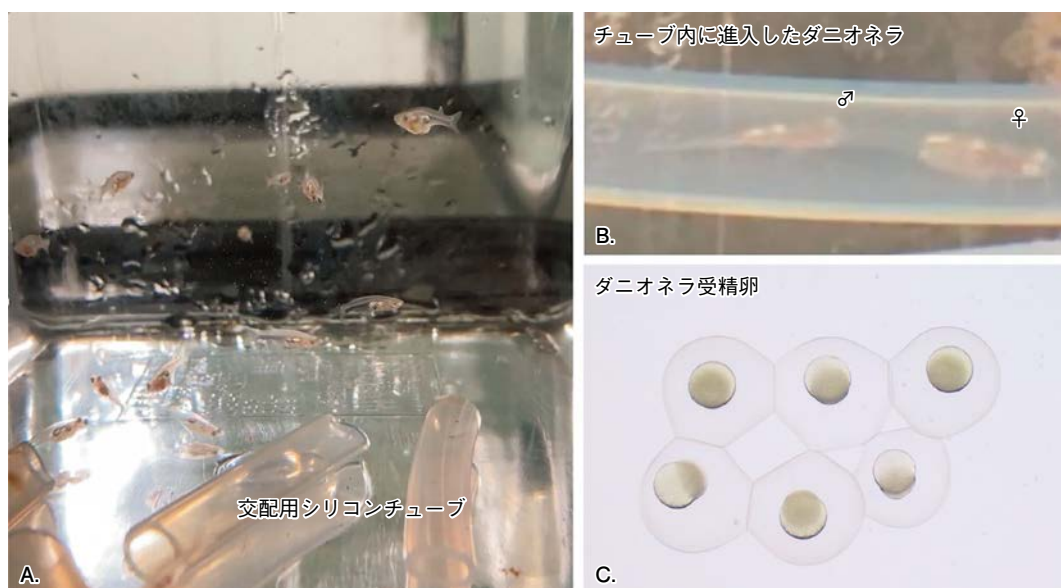


図 4 ダニオネラの交配

シリコンチューブを残置したタンクにダニオネラの雌魚と雄魚を混在させると (A), 雄魚と雌魚がチューブ内で交配し (B), 雌魚が受精卵の凝集体を放出する (C)。

当たりの給餌量を減らし、給餌回数を増やすことで対応可能である。

ダニオネラを研究に利用するうえで最も困難であるのは、ゲノム編集や遺伝子導入実験に必要となる受精卵を安定的かつ継続的に収集することである。ゼブラフィッシュの場合は、前日に雌魚と雄魚を交配用タンクに配置して仕切りで分けておくと、翌日の朝に室内灯を点灯して仕切りを外すことで速やかに交配が誘導され、～300 個ほどの受精卵を得ることができる。一方、ダニオネラの交配には沈下した障害物(シリコンチューブ)が必要であり⁶⁾、この中に雌魚と雄魚が進入して交配し、10-20 個の卵を産むことが知られている(図 4)。したがって、交配行動がゼブラフィッシュとは大きく異なるため、ゼブラフィッシュの採卵を効率的に実施できる交配用タンクはダニオネラの採卵には適さない。また、ゼブラフィッシュが照明に依存して速やかに交配・産卵するのに対し、ダニオネラは照明の点灯タイミングにそれほど依存せず、散発的に一日中交配・産卵する傾向があり、そのタイミングを制御することが難しい。現在筆者らは、雌魚と雄魚を複数飼育するタンクにシリコンチューブを常時沈めて採卵用タン

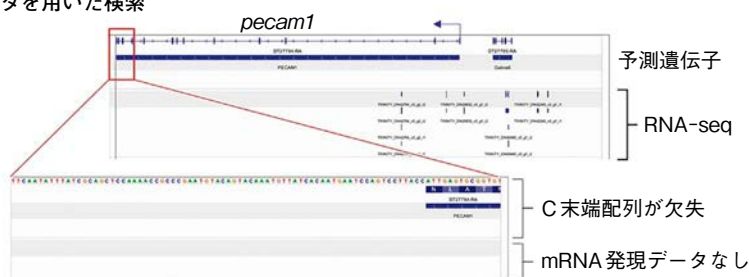
クとしている。十分な個数を用意したこの採卵用タンクを定期的に巡回し、受精卵を回収して遺伝子改変実験を実施している。

IV ダニオネラのゲノム情報整備

これまでに、*D. translucida* のゲノム配列情報および発現遺伝子の情報が報告されている⁷⁾。しかし、この解析に使用した個体は *D. cerebrum* である可能性が指摘されており²⁾、今後の確認が必要である。このゲノム解析結果と発現遺伝子情報は figshare 上に公開されており (<https://doi.org/10.6084/m9.figshare.c.4437488.v1>)、ここからダウンロードしたデータを Interactive Genomics Viewer (IGV) 上で展開し、ダニオネラのゲノム配列情報や遺伝子発現情報を検索することができる。筆者らもこの情報を用いて CRISPR-Cas9 をデザインし、複数の遺伝子改変ダニオネラを作製することに成功している。

この既報の解析では Nanopore のロングリードシークエンスと Illumina のショートリードシークエンスを組み合わせたゲノムアセンブリを実施しているものの、得られたゲノム配列や遺伝子発現情報は実質的にショートリードシークエンスに

A. 既報ゲノムデータを用いた検索



B. 新規ゲノムデータを用いた検索

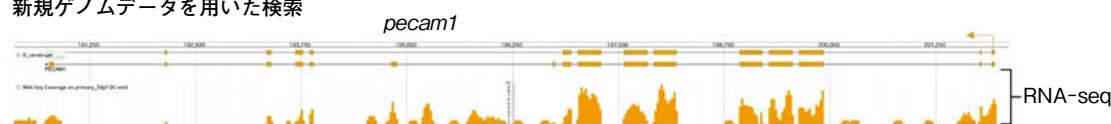


図 5 ダニオネラゲノム情報の解析例

既報のダニオネラゲノム情報を用いた解析では *pecam1* 遺伝子の C 末端側の情報が欠損していたが (A), 筆者らが新たに得たゲノム情報を用いた解析では *pecam1* 遺伝子全長の情報が得られている (B)。

由来する⁷⁾。この問題に起因するのか、あるいは他の技術的な問題が存在するのか現時点で定かではないが、この既報のダニオネラゲノム情報は全ゲノム領域を包含するものではないことを示唆する事例がみられている。例えば、血管内皮細胞のマーカー遺伝子 *platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (pecam1)* を検索すると、C 末端領域のエクソン情報が欠落し、mRNA の発現も検出されない (図 5A)。したがって、ダニオネラをモデル生物として広く利用していくためには更に高精度のゲノム情報基盤を整備する必要があると考え、筆者らはナノポアよりもリード長が長く、正確性が高いとされる PacBio を用いた全ゲノムシーケンスを実施した。

更に、微量発現遺伝子・組織特異的遺伝子の発現検出率の向上を目指し、ダニオネラ成魚の各臓器から mRNA を抽出してシーケンスを実施した。得られたゲノムアセンブリの精度を BUSCO 解析により調べたところ、既報のゲノムアセンブリの値が 90.3% (筆者らによる再解析結果) であるのに対し、今回得られたゲノムアセンブリの値は 94.8% となり、十分な改善が認められた。前述した *pecam1* を例とした解析でも、筆者らのゲノム情報を用いることで遺伝子全長のエクソン配列と mRNA が検出されている (図 5B)。以上の結果を総合し、高精度のダニオネラゲノム情報基盤

を整備することができたと考えており、現在一般公開用のゲノムブラウザを開発中である。

おわりに

1986 年のダニオネラ発見の報告以降、この小型魚類の形態学的・解剖学的な研究は進んできたが、遺伝子改変技術を用いた研究は 2018 年の報告が最初である⁵⁾。これ以降に報告された研究でも遺伝子改変系統の作製が報告されているものの、その総数はわずか 5 系統にとどまる。このことからわかるように、ダニオネラを用いたゲノム編集や遺伝子導入実験は、ゼブラフィッシュなどの既存の小型魚類を用いた実験と比較すると容易ではない。前述のように、この困難の大部分はダニオネラの受精卵を安定的かつ継続的に収集することが難しいことに起因しており、今後ダニオネラにおける採卵効率の上昇が望まれる。

ダニオネラは成体においても高い組織透明性を保持すると同時に、神経行動機能をはじめとする複雑な成体組織機能を有する極めてユニークな生物である。標準的なモデル動物であるマウスやこれまでイメージング研究に利用されてきたゼブラフィッシュと異なり、ダニオネラでは一生を通じてほぼすべての臓器において、生きている細胞を生理的な条件下で経時的にイメージングできる。脊椎動物において、このようなイメージング解析

が可能であるほぼ唯一の実験動物モデルがダニオネラであると言える。ダニオネラは、音声コミュニケーションをはじめとする神経生理機能の解明のみならず、組織の形成と恒常性維持、病態の発症と進展、老化から個体の死に至る過程など、成体において生じる様々な生理現象の理解に役立つと考えられる。また、淡水魚として世界最小の成体サイズであるという特徴を活かした個体全体の高速イメージングも可能であるため、様々な生理病態機能を臓器同士の機能連関という視点から解析することもできる。今後、ダニオネラが生命科学・医学研究における新たな基盤的モデル動物として発展し、生命現象と病態形成機構の理解に多大な貢献を果たす未来の実現を期待したい。

●文 献

- 1) Roberts TR : *Environ Biol Fishes*. **16** : 231-241, 1986
- 2) Britz R, Conway KW, Rüber L : *Sci Rep*. **11** : 18942, 2021
- 3) Haynes EM, Ulland TK, Eliceiri KW : *Front Mol Neurosci*. **15** : 867010, 2022
- 4) Britz R, Conway KW : *J Morphol*. **277** : 147-166, 2016
- 5) Schulze L, Henninger J, Kadobianskyi M et al : *Nat Methods*. **15** : 977-983, 2018
- 6) Rajan G, Duroure K, Del Bene F : *Danionella translucida*, a tankful of new opportunities. In: D'Angelo L, de Girolamo P (eds.) : *Laboratory Fish in Biomedical Research*, pp409-418. Elsevier Science, Amsterdam, 2022
- 7) Kadobianskyi M, Schulze L, Schuelke M, Judkewitz B : *Sci Data*. **6** : 156, 2019