

平成 23 年度名古屋大学技術職員研修(生物・生体コース)を受講して

○森ララミ^{A)}、前坂昌宏^{A)}、瀧健太郎^{B)}、鴻田一絵^{A)}

^{A)} 教育・研究技術支援室 生物・生体技術系

^{B)} 医学系技術支援室 生物・生体技術系

概要

我々は平成 23 年 8 月 31 日～9 月 2 日に開催された平成 23 年度名古屋大学技術研修において、「生物・生体コース」を受講した。研修テーマは「メダカの人工授精」で、目的は「人工授精の基本的技術の習得」であった。研修は講義と実習に分かれており、講義では実験動物としての小型魚類の重要性とその遺伝子操作技術について学んだ。その後の実習では人工授精技術に焦点をあて、基本的な操作を学んだ。本発表では研修で学んだ内容について報告する。

1 はじめに

メダカ(ニホンメダカ、学名 *Oryzias latipes*)は日本、台湾、朝鮮半島、中国など東アジアから東南アジアにかけて分布する小型淡水魚である。日本では北海道を除く各地に広く生息していたが、近年では生息可能環境が減ったためか、絶滅危惧種に指定されるほど生息数が減少している。そのような身近な生物であるメダカは実験動物として優れた特性を持っており、発生学や遺伝学などの分野で多くの研究成果をあげている。日本ではメダカの研究が進んでおり、名古屋大学におけるメダカの研究は世界に広く知られている。研修が開催された生物機能開発利用研究センターでは半世紀を超えるメダカの研究の歴史があり、自然突然変異で生まれたメダカを中心とする約 50 系統のメダカが飼育されている。また文科省のナショナルバイオリソースプロジェクトの中心機関を担当したこともあり、メダカのバイオリソースの収集・保存・提供で中心的な役割を担っている。今回の研修では、名古屋大学での半世紀にわたるメダカの研究の歴史と、基本的な実験手技である人工授精技術を実習形式で学んだ。本発表では、研修で学んだ実験動物としてのメダカの特徴と代表的な系統について紹介する。

2 なぜメダカなのか

メダカの特徴として、①小型(成魚で体長約 3cm、体重 0.4g)のため、狭いスペースで多くの個体を飼育できること、②生息温度域(1～37℃)、塩類濃度域(海水でも飼育できる)が広く、飼育が容易であること、③維持管理費が少ないこと、④2-3 ヶ月の短い世代サイクルのため、遺伝学的研究に向いていること、⑤多産で、産卵が人為的にコントロールでき、一定の条件下では年中産卵すること、⑥体外受精で卵が透明であるため、胚発生の観察が容易であること(図 2)、⑦哺乳類に比べ体制が単純でゲノムサイズも小さいため、研究がやりやすいこと、⑧多くの変異体(体色、ひれの形状など)が単離・系統保存されているため、遺伝学的研究がしやすいことなどが挙げられる。メダカゲノムはヒトゲノムと相同性が大きく、脊椎動物の進化やヒトの疾病の原因を研究するうえで有用であると期待されている。2007 年にはメダカのゲノム解読が完了し、遺伝子ノックアウト作出技術が確立されるなど、メダカの研究基盤は着実に進歩してきている。

メダカとともに広く研究に利用されている小型魚類の代表に、ゼブラフィッシュ(学名 *Danio rerio*)がある。

ゼブラフィッシュも基本的にはメダカと同じ特徴を持っているが、いくつかメダカ特有の利点がある。その利点として、①生息温度域が広いこと(ゼブラフィッシュは熱帯魚であるため、22～30℃と狭い範囲でしか生息できない)、②近交系が多数確立されていること、③ゲノムサイズが小さいこと、④性染色体(XY 染色体)が存在すること(ゼブラフィッシュの性決定機構はよくわかっていない)、⑤胚の透明度がゼブラフィッシュより高く、内蔵器官が観察しやすいことなどが挙げられる。



図 1. メダカ(上)とゼブラフィッシュ(下)



図 2. 小型魚類の胚

3 メダカの系統

メダカには数多くの自然発生突然変異体や近交系、さらには遺伝子改変メダカが存在する。その中で研究に有用な系統の一部を紹介する。

3.1 透明メダカ

メダカは4種類の色素(黒、黄、白、虹色)の有無あるいは反応性の違いによって様々な色調を示す。名古屋大学の若松らのグループは皮膚の色素が少ない突然変異種を選抜し、交配を重ねることによって、黒、白、虹色の3種類の色素を欠いた、体が透けて脳や内蔵が見える透明メダカを開発した(図3)。体が透けて見えることにより、解剖を行わずに生物の内蔵の様子をそのまま研究できるという新たな手法が確立された。このような手法はマウスなど哺乳類で確立されていないのはもちろん、魚類なかでもメダカ特有の手法である。

3.2 光るメダカ

発光クラゲ由来の緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を組み込み、ある特定部位を蛍光で可視化した“光るメダカ”が開発されている(図4)。この技術はマウス・ラットなど哺乳類でも確立されているが、メダカ受精卵への遺伝子微量注入(マイクロインジェクション)は、マウスなど哺乳類のもの比べると安価かつ、簡便に作製・維持することが可能である。またメダカは受精卵が大きく透明で直径1mmあり(マウスは約100μm)、産卵期には毎日50～100個の受精卵を得ることができること、体外受精のため、哺乳類などと違い、遺伝子を注入した胚を母親に戻す必要がなく、そのまま発生をリアルタイムに生きたまま観察し続けることができる利点がある。これらの利点を活かして、これまでに世界中で様々な光るメダカが作られてきている。例えば、血球が光るメダカ、環境ホルモンで肝臓が光り出すメダカ、生殖腺が光るメダカ、骨が光るメダカなどが有名である。

3.3 透明で光るメダカ

前項で述べた透明メダカと光るメダカの交配を重ね、“透明で光るメダカ”を名古屋大学の若松らのグループが開発した。この技術により、発生の早い段階だけでなく、成体から老化の時期まで特定の組織における遺伝子の発現をリアルタイムで詳細に観察することができるようになった。このメダカを利用し、内分泌攪乱化学物質(環境ホルモン)の影響の過程を体外から観察することに成功するなど、多くの知見が得られている。

今後は遺伝子の設計を変えることで、様々な組織・器官での応用が期待されている。

3.4 ノックアウトメダカ

従来、脊椎動物で遺伝子破壊(ノックアウト)できるのはマウスだけであった。しかし、作製に1年以上を要し、費用も外注すれば数百万円という費用が発生する。また作製後もクリーンな環境下で飼育する必要があり、個体の維持費も膨大にかかるのが現状である。一方、ノックアウトメダカの作製費用は30~100万円程度で、マウスに比べると安価である。また作製に要する期間も1ヶ月程度と短いことも利点の一つである。さらに設備の面でもマニピレーターや顕微鏡は安価なもので十分であり、衛生面でも無菌操作のようなものは必要としない。

現在、ヒトの疾病に関する研究は主にマウスがモデル動物として使用されており、疾病に関わる特定の遺伝子を破壊したノックアウトマウスなどの遺伝子改変マウスが開発され、多くの知見が得られている。しかし、マウスの皮膚は透明でないため、体内で進行する病気の様子や転移過程を外表面から観察することはできない。メダカを使って生体内の病気の進行や転移過程を動物個体のまま、肉眼で観察、研究ができれば、病気の解明や新しい治療法を開発していく上で非常に大きな進歩となると期待されている。



図3. 透明メダカ

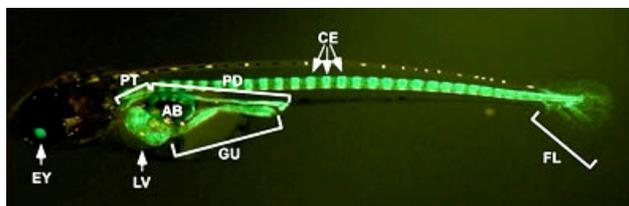


図4. 内蔵器官が光るメダカ

4 ナショナルバイオリソースプロジェクト

ナショナルバイオリソースプロジェクト(NBRP)は、ライフサイエンスの研究に用いられるバイオリソース(生物遺伝資源)の収集・保存・提供の体制の整備を目的とした、文部科学省主導の国家プロジェクトである。日本国内で各研究組織において開拓・保存されている様々な生物遺伝資源の有効活用するため、生物遺伝資源に関する知識や遺伝子情報の集約・保存事業を行っている。メダカについてのバイオリソースプロジェクトも存在し、ゲノム解析により得られた塩基配列、転写開始点の情報などがホームページ上に公開・提供され(図5)、各種系統の維持・提供を行っている。



The screenshot shows the NBRP Medaka website interface. It includes a search bar, a navigation menu, and a table of system categories. The table lists 'Wild populations' (66), 'Related species' (21), and 'Inbred strains' (10). Below the table, there are sections for 'Medaka Resources' and 'Medaka cDNA/BAC/Fosmid' with associated statistics.

系統分類	件数
Wild populations	66
Related species	21
Inbred strains	10

cDNA
ライブラリ数: 33
総Entry数: 730259

BAC
ライブラリ数: 1
総Entry数: 110017

Fosmid
ライブラリ数: 2

図5. NBRP-Medaka のデータベース (URL : <http://www.shigen.nig.ac.jp/medaka/>)

5 まとめ

今回の研修で、実験動物としてのメダカの重要性について多くを学ぶ事ができた。またメダカの系統を作出・維持していくために必要不可欠な人工授精技術について、実習形式で丁寧に指導いただいた。短期間の実習であったため、習得するまでには至らなかったが、今後の業務に活かしていきたい。また他の実験動物種についても学習し、さらに知識を深めていきたいと思う。

6 謝辞

今回の研修に際して、ご指導いただきました生物機能開発利用研究センターの日比正彦教授、井上慎子技術職員に深く感謝いたします。また研修を企画・準備いただいた厚味智子技術班長ならびに技術研修会の委員の皆様にも感謝いたします。

参考文献

- [1] 井上 慎子 (2011)：平成 23 年度名古屋大学技術職員研修(生物・生体コース)配布テキスト.
- [2] 岩倉 洋一郎, et al (2002)：動物発生工学, 朝倉書店.
- [3] 若松 祐子(2003)：施設紹介, 名古屋大学理学部・大学院理学研究科広報誌, 5.
- [4] 武田 洋幸(2004)：メダカー 日本が育てたモデル動物, 生命誌ジャーナル 2004 年秋号, JT 生命誌研究館.
- [5] 中辻 憲夫(1993)：発生工学のすすめ, 羊土社.