

cDNA マイクロアレイを用いた
メダカ温度適応関連遺伝子の網羅的解析

平山 真

目 次

	頁
緒言	1
謝辞	8
略語	9
第1章 メダカ各地域集団由来培養細胞の温度依存的な増殖曲線と 遺伝子発現	12
第1節 メダカ各地域集団由来培養細胞の温度依存的な増殖曲線	14
第2節 メダカ各地域集団由来培養細胞における温度適応関連 候補遺伝子の発現	18
第3節 考察	24
第2章 ESTライブラリーを用いたメダカcDNAマイクロアレイの構築	28
第1節 ESTデータベースを利用したcDNAクローンの選出	30
第2節 メダカcDNAマイクロアレイの構築	35
第3節 考察	42
第3章 cDNAマイクロアレイを用いた温度適応関連遺伝子の網羅的 探索	44
第1節 北日本集団由来培養細胞を対象とした温度移行に伴う 経時的な遺伝子発現プロファイルの作成	46
第2節 北日本および南日本集団由来培養細胞における 温度依存的な遺伝子発現の比較	55
第3節 考察	60
第4章 総合的考察	64
参考文献	68
図表	78

緒 言

多くの生物でその生息は種特有な地域に限定される。これらには、地理的条件や気候などのほか、食性などの二次的なものも含めて環境温度の影響が非常に大きい。恒温動物である哺乳類や鳥類は比較的広範囲の緯度で生息可能であるが、その他多くの生物は変温動物で、環境温度に依存して生息しなければならない。生体内の化学反応の多くが温度依存性を示すため、変温動物では生体内代謝や運動能力は環境温度によって大きな影響を受けると考えられ、これを反映して変温動物の生息可能域は限られる。魚類が生息する水界は空気と比べて比熱および粘性が大きく、魚類は地上で生息する生物と比べてその温度の影響をより強く受けるものと考えられる。そのため魚類は、この特殊な環境にうまく適応する機構を進化の過程で獲得してきたと予想される。

このような魚類の温度適応機構の解明を目指して、これまでに環境水温の変化に伴う酸素消費量、酵素活性、タンパク質合成、脂質成分の変化などが検討されてきた。一例として、極地域に生息する魚類にみられる **anti-freeze protein** がある。南極海や北極海では 0°C を下回るような極端な温度環境下でも生命活動を維持しなくてはならない。本タンパク質には4種のタイプが存在し、極地に生息する多数の魚類で合成される (Harding et al., 2003)。これらは氷と結合してその成長を阻害することにより、体液に耐凍性を与える。

一方、温帯域では季節的に水温が大きく変化し、その温度変化が大きなストレスとなる。このような地域に生息する広温域性魚類は、 0°C 近くから 30°C 以上という幅広い温度域に対応しなくてはならない。そのため、これら広温域性魚類は、特別な温度適応機構を有することになる。例えば、Cossins and Prosser (1978) はキンギョ *Carassius auratus* 脳組織中のシナプトゾーム膜で低温馴化に伴い不飽和脂肪酸の占める割合が高くなることを報告しており、これは低温における生体膜の流動性の保持に役立つと考えられている。

このように、魚類は季節的に変化する水温に応じて体成分を変化させ、それぞれの温度における生存能力を獲得していると考えられる (Hazel and Prosser,

1974)。これは温度馴化 (temperature acclimation) と呼ばれ、古くより多くの研究者の興味を引いてきたが、近年の分子生物学の発展は、本機構の分子レベルでの解明へと導きつつある。なかでも、代表的な広温域性魚類であるコイ *Cyprinus carpio* やキンギョは実験室内で温度馴化過程を再現できることもあり、有用な実験動物として詳しく解析されてきた。例えば、コイでは馴化温度に依存して発現量が変化するミオシン重鎖アイソフォームの存在が示されている

(Hwang et al., 1990, 1991; Guo et al., 1994; Chaen et al., 1996; Hirayama and Watabe, 1997; Nakaya et al., 1997; Watabe et al., 1998; Kakinuma et al., 1998, 2000)。これらは 10°C型、中間型および 30°C型の 3 種類の成体速筋型ミオシン重鎖アイソフォームとよばれるが、それぞれの熱安定性およびアクチン活性化 Mg^{2+} -ATPase 活性が明確に異なる。このようにして、コイは環境温度の変化に対応してミオシン重鎖アイソフォームの組成を最も適したものに变化させ、遊泳能力を一定に保つ。

また、ミトコンドリア ATP 合成酵素も温度馴化機構と密接に関連することが最近の研究から明らかにされている (Kikuchi et al., 1999; Itoi et al., 2003)。すなわち、コイのミトコンドリア ATP 合成酵素の発現量は高温馴化魚に比べて低温馴化魚において高く、加えてその単位タンパク質重量あたりの酵素活性も低温馴化魚で高い。これは低温環境下でのエネルギー産生能力の低下に対する補償機構と考えられる。

魚類の温度適応関連タンパク質の探索を行うにあたり、本研究ではその対象をメダカ *Oryzias latipes* とした。メダカは卵生の淡水魚で、日本を含むアジア東部地域に生息する広温域性小型魚類であり、0°Cから 40°C近くという幅広い温度域で生息することが可能である。また本種は、魚類で最も多くの近交系が存在することでも知られる。ここで近交系とは 20 世代以上兄妹間で交配を繰り返したものを指し、遺伝的に均一であると考えられる。それらの例としては、北日本集団 HNI 近交系、南日本集団 AA2 近交系、および南日本集団由来性染色体上色素変異系統である HdrR などが知られる (Hyodo-Taguchi and Egami, 1985)。これらの系統および自然発生突然変異体は、東京大学大学院新領域創成科学研究

科、新潟大学理学部、放射線医学総合研究所および名古屋大学生物分子応答研究センターなどにおいて保存されている（若松・尾里, 1998）。突然変異系統の蓄積はゼブラフィッシュ *Danio rerio* などの他のモデル生物でも多いが、これらはほとんど誘発突然変異である（Driever et al., 1996）。メダカの自然突然変異系統の蓄積はその点でユニークである。自然突然変異はさまざまに組み合わせられ、コンジェニック系統に発展するなど、より高度の研究に用いられる系統に作出されてきた（Wakamatsu et al., 2001）。トランスポゾンも自然突然変異の利点を巧みに利用して発見されたものである（Koga, 2002）。

魚類の温度適応機構の解明に有効な方法の一つとして、近縁種や地域集団を比較する方法がある（Oleksiak et al., 2002, 2005; Slechtova et al., 2004）。Oleksiak et al. (2002) はフンドゥルス科のマミチヨグ *Fundulus heteroclitus* を対象に cDNA マイクロアレイを用いた実験で、アメリカ Maine 州に生息する北方集団と Georgia 州に生息する南方集団間の遺伝子発現に有意な相違があることを明らかにし、それぞれの地域集団が異なる環境下へ適応をしていることを示唆した。一方、メダカでも遺伝的に離れた 4 つの地域集団が存在する。これらは韓国東南部に生息する東韓集団、中国と韓国西部に生息する中国-西韓集団、日本海に面した東日本に生息する北日本集団、および太平洋に面した東日本とそれ以西に生息する南日本集団からなり（Sakaizumi et al., 1983; Sakaizumi, 1986; Sakaizumi and Jeon, 1987）、これら地域集団の地理的多様性は核ゲノムにコードされるアロザイムによって示されている。Naruse et al. (2000) は北日本および南日本由来の近交系間で高い多型の存在を明らかにした。

ところで、魚類培養細胞は個体が生息している温度域で生育が可能である（Bols et al., 1992）。冷水魚のニジマス *Oncorhynchus mykiss* 生殖腺に由来する RTG-2 細胞は 26℃を越える温度域では増殖できないが（Mosser et al., 1986）、広温域性魚類であるキンギョ尾鰭由来培養細胞は 37℃でも増殖可能である（Shima et al., 1980; Kondo and Watabe, 2004）。上記のマミチヨグを対象とした Oleksiak et al. (2002) の報告と合わせ、培養細胞が成育できる温度域は異なる魚種間のみならず、同種の異なる地域集団間で異なっていることが期待される。

これまでに、メダカは手軽で便利な実験動物として、生物学の多くの分野で用いられてきた。近年においては、一定の条件下で毎日産卵し、飼育面積を取らない、世代交代が早い、などの利点から、トランスジェニック技術などの遺伝子工学的アプローチにより遺伝子の詳細な機能解析を行う対象、すなわちモデル生物として認められてきた。また、すでにモデル生物としての地位を確立した、同じ小型魚類ゼブラフィッシュでゲノムサイズが 1,700 Mb であるのに比べて、メダカは 800 Mb と、ゲノム学および遺伝子工学的研究における有用性が見直されてきている (Wittbrodt et al., 2002; Shima and Mitani, 2004)。とくに最近、expressed sequence tag (EST) 解析やそれを用いた連鎖地図の作成、さらにはゲノム解析が進行中であり、ここ 2006 年 1 月に 3 度目のバージョンアップが行われる予定である。

遺伝子発現を網羅的に解析する方法として、Schena et al. (1995) によりマイクロアレイ技術が報告された。本法はスポット型アレイ、または cDNA マイクロアレイと呼ばれ、ノザンブロットで用いられるプローブに相当する DNA 断片をスライドガラス上にスポットして固定し、RNA を鋳型に蛍光標識 cDNA を作製し、同様に別の蛍光物質で標識された対照群由来の cDNA とともにハイブリダイゼーションすることにより、実験群と対照群の mRNA 蓄積量を比較するものである。実際、1 枚のスライドガラス上には数千の cDNA を固定することができ、何千という遺伝子の発現量の変化を同時にモニタリングすることが可能となった。マイクロアレイ技術にはスポット型マイクロアレイと、半導体チップ作製の技術を応用したオリゴヌクレオチドアレイと呼ばれるものがある。後者は数十塩基がスライドガラス上に固定されており、配列特異性が高く、発現解析のほか 1 塩基多型 (single nucleotide polymorphisms, SNP) の包括的な検出などにも用いられている (Wirtenberger et al., 2005)。一方、cDNA マイクロアレイでは各スポットに含まれる塩基配列は数百から数千塩基であり、SNP の影響は小さい。また 2 つの異なる試料から得られた RNA を 1 枚の共通のマイクロアレイに同時にハイブリダイズできることから、片方の試料が内部対照となり、蛍光強度の倍率変化や差として表される。

本研究では上述したようなメダカのゲノム情報や遺伝的特性に着目するとともに、最先端の cDNA マイクロアレイ技術を取り入れて、温度適応に関する研究を行った。

第 1 章では、北日本集団メダカ由来細胞 4 株、南日本集団メダカ由来 4 株、東韓集団メダカ由来 OLSOK-e7 株、さらに対照として東南アジアに生息するセレベスメダカ *Oryzias celebensis* 由来 CE-1 株の線維芽細胞を実験に供した。北日本および東韓集団由来各細胞株は、33°C から 15°C へ移行した後 11 日目で温度移行前の 2 倍以上の細胞数を示した。南日本集団由来各細胞株およびセレベスメダカ由来 CE-1 株ではこの温度で、細胞数は一定もしくは逆に減少傾向にあった。一方、33°C から 4°C へ温度移行したところ、北日本集団由来 3 株および東韓集団由来 OLSOK-e7 株では細胞数はほとんど変化しなかったが、その他の細胞株は減少傾向を示した。とくに、セレベスメダカ由来 CE-1 株は 3 日後にはほとんど全ての細胞が死滅した。

次に、温度依存的な発現変動が示唆されている既報の 102 遺伝子の配列をメダカ EST データベースから抽出し、25°C で 7 日間培養した北日本集団由来 OLHNI-1 株を対象に reverse transcription (RT) -PCR に供して、33°C で同日数培養したものの遺伝子発現と比較した。その結果、heat shock protein (HSP) 47 遺伝子 (*HSP47*) は 33°C の方で、inhibitor of nuclear factor- κ B α 遺伝子 (*I κ B α*) および Rab family protein 1c 遺伝子 (*Rab-1c*) を含む 12 遺伝子は 25°C の方で mRNA 蓄積量が高かった。さらに、RT-PCR により温度依存的な発現が明瞭に示された *I κ B α* および *Rab-1c* 両遺伝子につき、北日本、南日本および東韓集団由来細胞のそれぞれ OLHNI-1、OLHdrR-e3 および OLSOK-e7 株を 15°C で 7 日間培養して定量的リアルタイム PCR に供し、33°C で同日数培養したものと比較した。その結果、OLHNI-1 および OLSOK-e7 株の 15°C における *I κ B α* の mRNA 蓄積量は 33°C での蓄積量に比べてそれぞれ 5 および 2 倍と有意に高かった。また、*Rab-1c* の mRNA 蓄積量は OLHNI-1 および OLSOK-e7 株で 33°C に比べて 15°C でそれぞれ 2 および 3 倍と有意に高かった。一方、OLHdrR-e3 株のこれら 2 遺伝子の mRNA 蓄積量は、15°C および 33°C で有意な差はみられなかった。以上の結果から、異

なる集団由来の細胞において、いくつかの遺伝子で mRNA 蓄積量が異なる温度依存性を示すことが明らかになった。

第 2 章では、メダカ EST ライブラリーを利用した cDNA マイクロアレイの作製条件を検討した。まず、北日本集団 HNI 近交系の尾鰭由来 OLHNI-1 株、その UV 照射および γ 線照射細胞、さらには同系統の卵巣および肝臓から構築した各 cDNA ライブラリーについての EST データベースから個々のクラスターに含まれる代表的なクローンを選別し、計 3,549 クローンを *in silico* で選択した。次に、各クローンにつき汎用プライマーを用いた PCR で挿入配列を増幅し、その一部につき異なる 3 種類の DNA 溶解液をそれぞれ用いて DNA 混合液を調製した。これら DNA 混合液を、コートしている化学物質の異なる 4 タイプのスライドグラスに供し、DNA の固定方法を検討した。その結果、DMSO 対応高密度化アミノ基導入スライドグラスおよび 50% (v/v) DMSO を加えた DNA 溶解溶液がスポットの形状および大きさともに最適であった。この条件下で各クローンを対象に、1 枚のスライドグラス上に PCR 産物を 2 スポットずつ、またネガティブコントロールとして用いる人工 DNA のスポットを含む、計 7,680 スポットからなる cDNA マイクロアレイを作製した。

第 3 章では作製した cDNA マイクロアレイを用いて loop design に従って温度依存的な遺伝子発現を調べた。まず、25°C で 1 ヶ月以上継代した北日本集団由来 OLHNI-e1 株を 33°C または 15°C へ移行し、0、1、3、12 時間、および 1、3、7 日目に全 RNA を抽出した。次いで、各処理時間の細胞由来の全 RNA を鋳型に、アミノアリル法により Cy3 または Cy5 で標識した cDNA プローブを調製した。異なる蛍光物質で標識した 2 つの処理時間由来の cDNA プローブを混合し、前節で作製した cDNA マイクロアレイに対してハイブリダイゼーション後、マイクロアレイスキャナーにより蛍光画像を取り込み、専用ソフトウェアによる画像解析に供した。各アレイにおける蛍光強度比を中央値で標準化し、Kruskal-Wallis analysis of variance (ANOVA) による統計解析を行ったところ、全 3,549 クローン中、33°C 培養細胞で 153 クローン、15°C 培養細胞で 348 クローンがいずれかの処理時間の間で有意差 ($P < 0.05$) を示した。これらのクローンでは、

33°C移行3時間目に mRNA 蓄積量が大きく増大または減少した。興味深いことにその増大および減少傾向は移行3日目に逆転し、さらに7日目では3時間目と同様の傾向に復元した。一方、15°C移行1時間目に多くのクローンで mRNA 蓄積量が減少し、3時間目では逆に増大する傾向を示した。その後、各クローンの mRNA 蓄積量は経時的に増大または減少した。このように、15°Cおよび33°Cへ温度移行したときの細胞の転写応答が大きく異なることが示された。

次に、25°Cで1ヶ月以上継代した南日本集団由来 OLHdrR-e3 株につき15°Cへ移行後0、3、12時間、および1、3日目に細胞を採取し、上記の北日本集団由来 OLHNI-e1 株と同様の方法で解析試料を調製した。両株で細胞増殖能に差のみられた15°Cで遺伝子発現プロファイルを比較したところ、15°C移行後3日目で127クローンの mRNA 蓄積量が両株間で有意に異なった ($P<0.05$)。すなわち、gelsolin (GSN)、myosin light polypeptide kinase isoform 6 (MYLK)、ribosomal protein L22 (RPL22) および tudor domain containing 7 (TDRD7) をコードするクローンの mRNA 蓄積量は OLHNI-e1 株で温度移行3時間目から増大または維持傾向にあったが、OLHdrR-e3 株では逆に著しく減少した。これらのクローンは細胞増殖、シグナル伝達、タンパク質合成および転写に関わる遺伝子で、OLHNI-e1 および OLHdrR-e3 株間で15°Cにおける代謝応答が大きく異なることが明らかとなった。さらに、GSNを含む複数の細胞外局在成分の mRNA 蓄積量が15°C処理 OLHdrR-e3 株で減少しており、本細胞株の15°Cでの細胞増殖能の低下との関連が示された。

最後に第4章で以上の結果を総括し、将来の研究の展望について考察した。

なお、本研究で得られた成果は以下の通り公表済みである。

1. Hirayama M, Mitani H, Watabe S (2005) Temperature-dependent growth rates and gene expression patterns of various medaka *Oryzias latipes* cell lines derived from different populations. J Comp Physiol 176B; in press

謝 辞

本研究は、東京大学 渡部終五教授のご指導、ご鞭撻の下に行われたもので、ここに深甚なる謝意を表す。

東京大学 三谷啓志教授からは多大なるご助言を頂くとともに、メダカ培養細胞の樹立や EST の使用など、本研究の実施に当たり種々のご指導を頂いた。心から謝意を申し上げる。

東京大学 阿部宏喜教授、渡邊俊樹助教授ならびに落合芳博助教授には、直接のご助言を頂いた。厚く御礼を申し上げる。

実験を進めるにあたり、多大なるご協力を頂いた東京大学 中谷操子博士、小林朋子氏に深く感謝する。

最後に、研究に際して何かと御手を煩わせた東京大学大学院 農学生命科学研究科水圏生物工学研究室ならびに新領域創成科学研究科動物生殖システム分野の皆様心から感謝申し上げます。

略 語

本論文では以下の略語を用いた。

ALAD: δ -aminolevulinic acid dehydratase

ANOVA: analysis of variance

ATP: adenosine 5'-triphosphate

ATPase: adenosine 5'-triphosphatase

BAC: bacterial artificial chromosome

BLAST: basic local alignment search tool

bp: base pair

C3: complement component 3

cDNA: complementary deoxyribonucleic acid

CKII: casein kinase II

COL2A1: collagen type II alpha 1

COP9: constitutive photomorphogenic 9

CSNK2A1: casein kinase 2 alpha 1

CYTL1: cytokine-like 1

DCN: decorin

dCTP: deoxycytidine 5'-triphosphate

DEPC: diethylpyrocarbonate

DMSO: dimethyl sulfoxide

DNA: deoxyribonucleic acid

DNase: deoxyribonuclease

dNTP: deoxyribonucleotide 5'-triphosphate

DTT: dithiothreitol

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid

EEF1A1: eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1

EEF2: eukaryotic translation elongation factor 2

EF-1 α : elongation factor-1 α

EIF3S2: eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2 beta

EST: expressed sequence tag
FSTL1: follistatin-like 1
GO: Gene Ontology
GRP94: glucose-regulated protein 94
GSN: gelsolin
H2AFV: H2A histone family member V
H2AFX: H2A histone family member X
HEPES: 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid
HMGB1: high mobility group box 1
HSP: heat shock protein
I κ B: inhibitor of NF κ B
ID1: inhibitor of DNA binding 1
ID3: inhibitor of DNA binding 3
kbp: kilo bp
KRT19: keratin 19
LB: Luria-Bertani
LDHB: lactate dehydrogenase B
Mb: mega base
mRNA: messenger RNA
MYLK: myosin light polypeptide kinase
ND1: NADH dehydrogenase subunit 1
NF κ B: nuclear factor- κ B
NHS: *N*-hydroxysuccinimide
PA2G4: proliferation-associated 2G4
PABPC1: poly(A) binding protein, cytoplasmic 1
PBS: phosphate-buffered saline
PCR: polymerase chain reaction
PMT: photomultiplier tube
PRDX1: peroxiredoxin 1
RELB: avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B
RNA: ribonucleic acid

RPL22: ribosomal protein L22
RT-PCR: reverse transcription-PCR
SDHD: succinate dehydrogenase complex subunit D
SDS: sodium dodecyl sulfate
SNP: single nucleotide polymorphism
SSC: standard saline citrate
TIM10: translocase of inner mitochondrial membrane 10
TDRD3: tudor domain containing 3
TDRD7: tudor domain containing 7
TGF: transforming growth factor
TNF: tumor necrosis factor
UBE2A: ubiquitin-conjugating enzyme E2A
UBE2D2: ubiquitin-conjugating enzyme E2D2
UPS: ubiquitin-proteasome system
WGS: whole genome shotgun
ZA20D2: zinc finger A20 domain containing 2
ZNF91: zinc finger protein 91
ZNF207: zinc finger protein 207

第1章 メダカ各地域集団由来培養細胞の温度依存的な増殖曲線と遺伝子発現

環境温度は多くの生物の分布を規定する主要な環境要因の1つである。季節的な水温の変化は数週間あるいは数ヶ月に渡って続き、その補償のために水温に晒される変温動物の生体内では代謝の再編成が行われる。しかしながらこの馴化機構は明らかにされていない部分が多い。

一方、メダカにはゲノムレベルのデータベース MBase (http://mbase.bioweb.ne.jp/~dclust/medaka_top.html) があり、これは EST データベースの MEBase、連鎖地図データベースの Medaka Linkage Map Database (MLBase) および bacterial artificial chromosome (BAC) クローンデータベースの Medaka BAC Database (MBBase) の3つのデータベースからなる。EST は、ゲノム解読に役立つだけでなく、ヒト (Miller et al., 1999)、マウス (Marra et al., 1999) およびコイ (Gracy et al., 2004) でなされているように網羅的な遺伝子発現研究を行う際に大きなツールとなる。メダカには 100,000 を超える EST クローンが単離されており、これらは数種の成体組織、胚体および培養細胞から単離され、約 23,000 のクラスターを構成している (Kimura et al., 2004; Mitani et al., 2004)。また、Mitani et al. (2004) による MBase の解析によって、各種の培養細胞株が様々な mRNA を発現しており、多様性の大きい cDNA ライブラリー作製のための良好な材料で、UV や γ 線照射などの物理的ストレスへ晒された際にも遺伝子発現が変化することが明らかにされた。したがって、メダカ培養細胞を用いて温度依存的な遺伝子発現を調べることにより、多くの温度適応関連遺伝子がスクリーニングできると期待される。

本章における目的は、培養細胞が成育できる温度域が地域集団間で異なっているかどうか、またこれらの多様性が何らかの遺伝子の発現パターンに反映されているかどうかを確かめることである。そこで、異なる温度環境下に生息する地域集団由来近交系メダカ培養細胞を樹立し、様々な温度で増殖曲線を比較した。次に、既報の論文 (Ju et al., 2002; Oleksiak et al., 2002; Itoi et al., 2003; Sasaki et al., 2003; Kondo and Watabe, 2004; Malek et al., 2004) を参考に MBase 上の EST

データベースから温度適応関連候補遺伝子を選出し、北日本集団メダカ由来培養細胞株における培養温度依存的な転写レベルの変化を RT-PCR により調べた。さらに、RT-PCR により確認された培養温度依存的に発現変動する遺伝子から *IκBα*、*Rab-1c* を選び、これらの発現パターンを異なる 3 地域集団由来の細胞を対象に調べた。

第1節 メダカ各地域集団由来培養細胞の温度依存的な増殖曲線

Bols et al. (1992) は、ニジマス生殖腺由来培養細胞 RTG-2 は個体が生息している温度域とほぼ等しい、あるいは多少それよりも高低温域で増殖できることを示した。すなわち、RTG-2 細胞の生存および増殖可能温度域はそれぞれ 0 - 28°C および 5 - 26°C で、最適増殖温度は 20°C であることを明らかにした。一方、ニジマス個体の生残および成長可能温度域はそれぞれ -0.7 - 26°C および 8 - 22°C で、最適成長温度は 17 - 19°C である。一方、温帯域に生息するキンギョは 0°C 付近から 40°C 近くの温度域で生息する広温域性魚類で、その尾鰭から樹立された培養細胞は 37°C でも増殖可能である (Shima et al., 1980; Kondo and Watabe, 2004)。また、Lannan et al. (1984) は、サケ科魚類の異なる組織や器官、胚体から樹立した細胞につき、増殖可能温度域が細胞種にかかわらずほぼ同様であることを示した。このように、魚類培養細胞はその種の生息する温度域に依存して増殖可能温度域が決定されていると考えられる。日本国内に生息するメダカも広温域性魚類で、0°C から 40°C 近くの温度域で生存が可能であり、また、熱帯域に生息する近縁種セレベスメダカの生存可能温度域は 10°C 以上から 40°C 近くである (岩松・半谷, 1989)。興味深いことに、メダカおよびセレベスメダカとも高温側の生存可能温度は変わらないにもかかわらず、低温側の生存可能温度は大きく異なっている。これはメダカが温帯域に生息域を拡大する上で獲得してきた耐性能であると考えられるが、*Oryzias* 属の地理的変遷については未だ明らかでない。

メダカはアロザイム解析により北日本、南日本、東韓および中国-西韓集団の 4 集団に分けられることが明らかにされた (Sakaizumi et al., 1983; Sakaizumi, 1986; Sakaizumi and Jeon, 1987)。これら 4 集団は地理的に大きく離れており、それらが生息する温度環境も異なる。本節では各地域に生息するメダカの細胞は固有の増殖温度領域を示すと予想し、北日本、南日本および東韓集団、およびセレベスメダカ由来培養細胞を対象に、種々の温度における増殖曲線を調べて比較した。

方 法

細胞培養

OL32株は南日本集団由来近交系メダカ HB32の尾鰭から (Komura et al., 1988)、CE-1株はメダカの近縁種であり熱帯地域に生息するセレベスメダカ *Oryzias celebensis* の胚体から樹立された (Arai et al., 1994)。

北日本集団由来近交系メダカ Kaga、南日本集団由来近交系メダカ CAB および HdrR、および東韓集団由来近交系メダカ SOK の胚体は受精後 5 日間、27°C で発生させた。27°C で飼育した CAB 系統および北日本集団由来近交系メダカ HNI の成体は 1 ppm のメチレンブルーで 1 晩消毒後、氷冷麻酔して尾鰭を一部切除した。胚体と鰭は Dakin's solution (58 mM NaOCl, 6 mM HCl, 93 mM NaHCO₃) の入ったプレートで 10 秒間処理して殺菌し、phosphate-buffered saline (PBS) を入れたプレートに移して洗浄した。洗浄操作をさらに 2 回繰り返して、10 mM 2-[4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid (HEPES)、20% (v/v) fetal bovine serum (Nippon Bio-Supply Center, Tokyo, Japan) および 50 µg/ml ストレプトマイシンを含む L-15 培地 (Irvine, CA, USA) 中に移した。鰭はそのまま、胚体は卵殻と卵黄を除去して同培地を含むプレートに移した後、滅菌したカミソリで十分に裁断した。その後、新鮮な培地を加えて 33°C で培養し、実験に供するまで 3 ヶ月以上継代した。各細胞株は Table 1-1 に示すように由来する生物種、系統、組織および作製した順番をもとに命名した。全ての細胞株は線維芽細胞様の形態を示した。

細胞増殖率の測定

細胞株は 10 cm² プレートに分取し、24 時間、33°C、L-15 培地中で培養し、プレート底面へ接着させた。各細胞株はその後、それぞれの温度に設定した恒温槽に移した。実験開始時の細胞数は、20°C および 25°C 実験群の OLHNI-2、OLCAB-2 および OLSOK-e7 株については 1.0×10^5 個、4°C、10°C および 15°C 実験群の OLHNI-1、OLHNI-2、OLKaga-e2、OLCAB-2、OLCAB-e1、OLCAB-e3、

OLHdrR-e3、OLSOK-e7 および CE-1 株については 2.0×10^5 個、35°C 実験群の OLHNI-1 および OL32 株も 2.0×10^5 個とした。OLHNI-e1 株については 15°C および 4°C のみ細胞数を計測し、その初期細胞数は 2.0×10^5 個とした。プレート当たりの細胞数は各測定温度および測定時点につき 3 プレートを測定した。実験開始 4 日および 7 日後に新鮮な培地と交換した。

細胞形態の観察

上記、15°C、10°C および 4°C で培養した OLHNI-1、OLHNI-2、OLKaga-e2、OLCAB-2、OLCAB-e1、OLCAB-e3、OLHdrR-e3、OLSOK-e7 および CE-1 株につき、Olympus DP50 (Olympus, Tokyo, Japan) で細胞の形態を観察した。

結 果

異なる地域集団由来メダカ培養細胞の温度依存的な増殖

異なる地域集団に由来する培養細胞の温度感受性の違いについて、各細胞を異なる温度で培養し、その成長速度を細胞数を測定することによって調べた。

北日本集団由来 OLHNI-2 株、南日本集団由来 OLCAB-2 株および東韓集団由来 OLSOK-e7 株を 20、25 および 33°C で 9 日間培養したところ、OLHNI-2 株の 33°C 培養区で他の 2 株に比べて 7 日後の細胞数がやや多い傾向にあった (Fig.1-1)。なお、OLCAB-2 株は 20、25 および 33°C とともに 7 日目以降は増殖せず、OLSOK-e7 株も 33°C では 4 日目以降、25°C では 6 日目以降の増殖はみられなかった。

低温側での培養については、北日本集団由来 OLHNI-1、OLHNI-2、OLHNI-e1 および OLKaga-e2、および東韓集団由来 OLSOK-e7 の 4 株は 15°C で 11 日間培養した結果、細胞数が 2 倍以上に増えた。一方、南日本集団由来 OLCAB-2、OLCAB-e1、OLCAB-e3 および OLHdrR-e3 株、およびセレベスメダカ由来 CE-1 株は増殖しなかった (Fig.1-2)。実際、OLCAB-e3 および CE-1 株の 11 日目の細胞数は実験開始時よりも減少していた。一方、4°C 培養区において、OLHNI-2、

OLHNI-e1、OLKaga-e2 および OLSOK-e7 株は細胞数をほぼ維持していたが、その他の細胞は全て減少する傾向にあった。とくに、CE-1 株は 4°C で 3 日目にはすでにほとんど全ての細胞が死滅していた。

高温側での培養においては、北日本および南日本集団由来細胞それぞれ OLHNI-1 および OL32 株を 35°C で培養したところ、OLHNI-1 株は温度移行 2 日目から細胞数が減少した (Fig.1-3)。一方、OL32 株は温度移行 2 日目まで 33°C に比べ 35°C で細胞数が多かった。それ以後は 33°C 培養に比べて細胞数が少なかったが、少なくとも測定期間の 9 日間は生存できることが示された。

細胞形態

低温培養下において細胞数の計測とともに細胞の形態変化を観察した結果、15°C 以下の温度では各細胞の形態が変化し、低温ほど細胞が小さかった (Fig. 1-4)。とくに OLHNI-1 株は 25°C 以下で凝集がみられ (図示せず)、15°C 以下で著しい凝集がみられた (Fig. 1-4A)。CE-1 株は 4°C では 3 日目で全ての細胞が小さく凝集していた。地域集団に特徴的な細胞形態の差はみられなかった。

第2節 メダカ各地域集団由来培養細胞における温度適応関連候補遺伝子の発現

これまでの研究により温度依存的な発現を示す遺伝子が複数得られている。例えば Itoi et al. (2003) により、ミトコンドリア関連タンパク質遺伝子が低温馴化したコイにおいて発現量を増大させることが示されている。また、培養細胞レベルでは Kondo and Watabe (2004) により、培養温度を上昇させたときに type I collagen および HSP70 遺伝子の発現が増大することが示されている。さらに、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (Sasaki et al., 2003) のほか、ゼブラフィッシュ (Malek et al., 2004) やマミチヨグ (Oleksiak et al., 2002) などの他魚種においてマイクロアレイによる解析がなされている。

本節では異なる集団間の温度耐性能の差異が遺伝的に決定されているかどうかを調べた。すなわち、温度依存的な発現が示されている遺伝子を既報の論文を参考にメダカ EST データベースから選出し、まず 15°C において細胞増殖のみられた北日本集団由来 OLHNI-1 株を対象に、選出した遺伝子の温度依存的な発現を RT-PCR で調べた。さらに、RT-PCR で変化のみられた遺伝子の一部につき、定量性の高いリアルタイム PCR により北日本、南日本および東韓集団由来の培養細胞それぞれ OLHNI-1、OLHDrR-e3 および OLSOK-e7 株における遺伝子発現を調べた。

方 法

温度適応関連候補遺伝子の選出

まず、温度によって発現量が増減する候補遺伝子を MEBase (http://mbase.bioweb.ne.jp/~dclust/medaka_top.html) を対象に検索した。その際、温度適応に関連する遺伝子を取り扱った酵母 *S. cerevisiae* (Sasaki et al., 2003)、チャネルキャットフィッシュ *Ictalurus punctatus* (Ju et al., 2002)、コイ (Itoi et al.,

2003)、キンギョ (Kondo and Watabe, 2004)、ゼブラフィッシュ (Malek et al., 2004) およびマミチヨグ (Oleksiak et al., 2002) のデータを参照した。選択した遺伝子をPCRで増幅する際に用いるプライマー対はPrimer3 program (Rozen and Skaletsky, 2000) により設計してSupplementary Table 1-1に示した。

試料

75 cm² プレート中、L-15培地で培養した北日本集団由来OLHNI-1株の細胞が底面に一様に増殖しコンフルエントとなった後、25°Cへ温度移行または33°Cで培養を続けた。温度移行1日目および4日目に培地を新鮮なものと交換した。温度移行7日目にISOGEN system (NIPPON GENE, Tokyo, Japan) を用いて全RNAを抽出した。すなわち、細胞が成育しているプレートから培地を除去後、75 cm² プレートに7 mlのISOGENを加え、スクレイパーで細胞をプレート底面より剥離後、15 mlチューブに移した。全ての細胞の抽出条件を揃えるため、一度、-80°Cで保存した。保存後の各試料は1週間以内に随時融解後、1.4 mlのクロロホルムを加えて15秒間激しく攪拌し、室温で3分間放置した。その後、10,000 x g、4°Cで15分間遠心分離し、得られた上清に3.5 mlのイソプロパノールを加えて軽く混和し、-20°Cで1晩放置した。その後、10,000 x g、4°Cで10分間遠心分離して上清を除いた。沈殿は70% (v/v) エタノールで洗浄した後、100 µlのdiethylpyrocarbonate (DEPC) 処理滅菌水に溶解した。抽出した全RNA 1 µlにつき分光光度計を用いて260 nmの吸光度から濃度を算定した。また全RNA 1 µlを電気泳動に供してRNAが分解されていないことを確認し、残りを使用まで-80°Cで保存した。

1st strand cDNAの合成

抽出した全RNAを鋳型にReverTra Ace-α[®] system (TOYOBO, Tokyo, Japan) を用いて1st strand cDNAを合成した。すなわち、全RNA 1 µgに5 x RT buffer 4 µl、dNTP mixture 2 nmol、RNase Inhibitor 10 U、Oligo(dT)20 10 pmolおよびReverTra Ace 1 µlを加えて20 µlとし42°Cで20分間、逆転写し、99°Cで5分間熱変性後、氷冷して反応を終了した。実験の再現性を確認するため、以上の実験を2度繰

り返した。

RT-PCR

滅菌水で 100 倍に希釈した 1st strand cDNA 1 μ l を鋳型として、10 x PCR buffer (500 mM KCl、15 mM MgCl₂ および 0.01%ゼラチンを含む 100 mM Tris-HCl、pH8.3)、4 pmol forward プライマー、4 pmol reverse プライマー、4 nmol dNTP および 0.25 U *Ex Taq* DNA ポリメラーゼ (TaKaRa, Otsu, Japan) を含む溶液に滅菌水を加えて反応液量を 20 μ l とした。用いた遺伝子特異的なプライマー対は Supplementary Table 1-1 に示す。反応は 94°C で 3 分間加熱後、94°C で 30 秒、60°C で 30 秒、72°C で 1 分のサイクルを 30 サイクル行い、最後に 72°C で 5 分間伸長反応を行った。メダカ β -actin (DDBJ/EMBL/GenBank データベース accession number S74868) および elongation factor-1 α (EF-1 α) (AB020734) をコードする各遺伝子を RT-PCR の内部標準として用いた。得られた増幅産物は 1%アガロース電気泳動により分離後、エチジウムブロマイド染色により検出した。染色強度の測定と定量は Electrophoresis documentation and analysis system 120 (Eastman Kodak, CT, USA) を用いた。

定量的リアルタイム PCR

上記 RT-PCR で用いた試料を鋳型に、*I κ B α* (AU241833)、*Rab-1c* (MEBase OLd57.04g) および *EF-1 α* を対象に、SYBR[®] *Premix Ex Taq* (TaKaRa) および Smart Cycler[®] II system (Cepheid, CA, USA) を用いて定量的リアルタイム PCR を行った。すなわち 2 x SYBR[®] *Premix Ex Taq*[™] buffer 12.5 μ l、5 pmol forward プライマー、5 pmol reverse プライマー、適宜希釈した 1st strand cDNA 2 μ l を合わせ、全量 25 μ l となるように滅菌水を加えた。検量線作成のため、鋳型 DNA を 10、100、1,000 および 10,000 倍と段階希釈したものを作製し、Smart Cycler[®] II system で 95°C 10 秒で初期変性後、95°C 5 秒、60°C 20 秒のサイクルを 45 サイクル行った。各遺伝子を増幅する際に用いたプライマー対は Supplementary Table 1-1 に示す。PCR 終了後、増幅曲線と融解曲線を調べつつ、各遺伝子の検量線から定量解析

を行った。各遺伝子の mRNA 蓄積量は *EF-1 α* の数値をもとに標準化し、相対量で示した。

各地域集団由来培養細胞における遺伝子発現

北日本集団由来 OLHNI-1、東韓集団由来 OLSOK-e7 および南日本集団由来 OLHdrR-e3 株は 75 cm² プレートにて 33°C で培養後、コンフルエントとなった後に 15°C へ温度移行、または 33°C で継続して培養した。培地の交換、全 RNA の抽出および 1st strand cDNA の合成は前述の方法で行った。さらに、各細胞株につき、前項のように *I κ B α* 、*Rab-1c* および *EF-1 α* を対象に定量的リアルタイム PCR を行った。これらの実験は 3 回繰り返して再現性を確かめた。

統計処理

15°C 培養区および 33°C 培養区間の統計処理には Student's *t*-test を適用した。

結 果

異なる温度における温度適応候補遺伝子の発現パターン

種々の生物種における温度適応に関する既知遺伝子を参照して、MEBase からメダカの温度適応候補遺伝子を探索した。その結果、102 個の候補遺伝子が抽出された。これらに加えてハウスキープング遺伝子である *β -actin* および *EF-1 α* を内部標準として用いた。選出された遺伝子の発現パターンを調べるため、北日本集団由来 OLHNI-1 株を対象に、コンフルエントに達した細胞を増殖することが前節により確認されている 25°C および 33°C で 7 日間培養して RT-PCR を行った (Fig. 1-5)。同様の実験を 2 回繰り返して、結果の再現性を確認した。

Supplementary Table 1-2 には、RT-PCR によって転写産物が確認された 69 遺伝子と、Hirayama et al. (2004) によりメダカの肝臓での発現が明らかにされている 2 つの高温馴化関連タンパク質遺伝子、*mWap65-1* および *mWap65-2* の結果を示した。エチジウムブロマイド染色像をデンストメータで定量したところ、2 回の繰

り返し実験ともに 33°C に比べて 25°C の mRNA 蓄積量が 1.25 倍以上高かった遺伝子が 12 個みられた (Fig.1-5, Supplementary Table 1-2)。これらの遺伝子は、poly (A) binding protein cytoplasmic 1 (PABPC1)、lactate dehydrogenase B (LDHB)、NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1)、I κ B α 、translocase of inner mitochondrial membrane 10 (TIM10)、Rab-1c、spermidine synthase、constitutive photomorphogenic 9 (COP9) signalosome、 δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAD)、tumor rejection antigen gp96 (または glucose-regulated protein 94, GRP94)、succinate dehydrogenase complex subunit D (SDHD) および α -F₁-ATPase をコードしていた。これとは対照的に、HSP47 の mRNA 蓄積量は 33°C に比べて 25°C で少なかった。 β -actin および EF-1 α の mRNA 蓄積量は 2 回の実験とも 25°C と 33°C で差はみられず、一方、*mWap65-1* および *mWap65-2* の増幅産物は認められなかった。

異なる地域集団由来培養細胞における I κ B α および Rab-1c mRNA 蓄積量の変化

前項の RT-PCR に供した温度適応に関連する 13 遺伝子全てについて、RT-PCR のプライマー対を用いて SYBR Premix Ex Taq (TaKaRa) および Smart Cycler[®] II system (Cepheid) による定量的リアルタイム PCR 解析を試みた。各遺伝子のプライマー対の増幅効率を調べた結果、I κ B α および Rab-1c を対象とするものが本解析に適することが明らかとなったため、これら 2 遺伝子を以後の実験に供した。Fig. 1-6 に示すように、北日本集団由来 OLHNI-1 株の試料 1 (Fig. 1-5) において、I κ B α および Rab-1c の転写産物量は 33°C に比べて 25°C でそれぞれ約 4 倍 および 3 倍高かった。一方、試料 2 の I κ B α および Rab-1c の転写産物量はそれぞれ 7.5 倍 および 2 倍高かった (図示せず)。これらの結果は RT-PCR の結果を支持した。

前述のように、北日本および東韓集団由来のそれぞれ OLHNI-1 および OLSOK-e7 株は 15°C で増殖可能であったが、南日本集団由来 OLHdrR-e3 株は同温度で細胞数を維持する傾向に留まった (Fig. 1-2)。これらの異なる地域集団由来細胞株間の増殖率の相違が、温度適応関連遺伝子の転写産物量の増減に関連するかどうかを調べるため、I κ B α および Rab-1c の mRNA 蓄積量を定量的リアル

タイムPCRにより調べた (Fig. 1-7)。OLHNI-1 および OLSOK-e7 株の *IκBα* mRNA 蓄積量は 33°C に比べて 15°C でそれぞれ 5 倍および 2 倍高く、*Rab-1c* についてはそれぞれ 2 倍および 3 倍であった。一方、OLHdrR-e3 株の *IκBα* および *Rab-1c* mRNA 蓄積量は 15°C および 33°C 培養区間で有意な差はみられなかった。

第3節 考 察

以上のように、メダカ培養細胞は、それらが由来する地域集団に固有の増殖可能温度範囲を有することが示された。南日本集団由来 OL32 株は 35°C で増殖できるが、北日本集団由来 OLHNI-1 株は同温度では細胞数が減少した。本研究では低温側に焦点を絞ったため、高温側における細胞数の計測は少ない細胞株数のみとなってしまった。

Arai et al. (1994) は高温耐性能が異なる南日本集団由来 OL32 株およびセレベスメダカ由来 CE-1 株を用い、これらの細胞株の高温耐性能の違いに HSPs が関わることを示唆している。本研究で差のみられた OLHNI-1 および OL32 株においても同様に HSPs が関わっている可能性がある。しかしながら、メダカおよび近縁種の生存可能な最高温度は温帯、熱帯に生息する種によらず 41°C から 42°C である (岩松・半谷, 1989)。一方、生存可能な最低温度は熱帯に生息するセレベスメダカでは 10°C 付近、温帯に生息するメダカ各地域集団は 0°C 付近と大きな差がみられ、これら最低生息温度の違いは遺伝的に決定されていることが異種交雑により示されている (岩松・半谷, 1989)。

メダカ属の地域拡散についての研究は報告されておらず推測の域を出ないが、両種間の低温側の生息可能温度の相違は、メダカが進化の過程で低温への適応能力を獲得してきたことを示唆する。したがって、本研究では異なるメダカ地域集団由来培養細胞の増殖率の違いが低温側で検出できると予測し、より多くの細胞株の増殖率を 15°C 以下の低温で比較した。北日本および東韓集団由来の全ての細胞株は 15°C で増殖可能であったが、南日本集団由来の各細胞株では 15°C でほとんど増殖がみられなかった。細胞増殖の温度依存性の相違はそれらが由来する個体の生息温度環境を反映しているものと予想される (Arai et al., 1994)。

北日本集団の HNI および Kaga 近交系はそれぞれ新潟県新潟市 (Hyodo-Taguchi and Egami, 1985) および石川県加賀市 (Shima et al., 1985) で採取された個体より樹立された。東韓集団の SOK 近交系は韓国の Kangwon 道 Sockcho 由来メダカ

から樹立された (Hyodo-Taguchi, unpublished)。南日本集団の CAB および HdrR 系統の正確な由来地域は明らかでないが、Takehana et al. (2003) によるアイソザイム解析のデータを参照すると、HdrR 系統の起源は神奈川県小田原市付近であると推測される。興味深いことに、これらの地域の気候は異なる。気象庁のデータベース (http://www.jma.go.jp/JMA_HP/jma/index.html) および韓国気象庁のデータベース (<http://www.kma.go.kr/index.jsp>) から上記の各地域について気温を調べた。その際、加賀市のデータが存在しなかったため、最も近い都市である小松のものを代用した。1年でも最も気温が低い月である1月の過去5年間の平均気温は新潟、小松、Sockcho および小田原でそれぞれ3°C、3°C、0°Cおよび6°Cであった。さらに、上記4都市のうち、データが得られなかった Sockcho 以外の3都市について、各年の最も寒い月である1月の1日当たりの平均、最低および最高気温を比較した。その結果、小田原に比べて新潟および小松の1月における最高および平均気温は全ての年で有意に低い ($P<0.005$) (Supplementary Fig. 1-1)。なお、Caissie et al. (2001) は確率論的モデルを用いて気温データのみから小さな小川における1日あたりの最高水温を予測できることを報告している。また Langan et al. (2001) はスコットランドの小川の水温が気温と強く相関していることを示している。メダカは浅い水域に生息することから気温と水温が強く相関すると仮定すると、メダカ培養細胞間の温度依存的増殖特性の相違は細胞が由来した集団の生息温度の違いに起因することが示唆される。

前述のように、Bols et al. (1992) は魚類培養細胞は由来する個体の生息温度域で増殖が可能であると報告している。ニジマス生殖腺由来 RTG-2 細胞は28°Cでは生存できないが (Mosser et al., 1986)、キンギョ尾鰭由来培養細胞は37°Cでも増殖可能である (Shima et al., 1980; Kondo and Watabe, 2004)。したがって、異なるメダカ地域集団由来培養細胞の増殖可能温度の違いは、遺伝的な差によるものと考えられる。

MEBase から選出したメダカ 102 温度適応候補遺伝子のうち、25°Cと33°Cで培養した北日本集団由来 OLHNI-1 株で13遺伝子の発現パターンが異なることが RT-PCR により示された (Fig.1-5)。これらには、分子シャペロンの HSP47

(Hirayoshi et al., 1991) および gp96 (Zheng et al., 2001)、タンパク質翻訳に關与する PABPC1 (Adam et al., 1986; Sachs et al., 1986)、同分解に關与する COP9 (Sun et al., 2002)、核酸の安定化に關わる spermidine synthase (Hashimoto et al., 1998)、ミトコンドリア構成成分の SDHD (Hirawake et al., 1999)、ND1 (Gadaleta et al., 1988)、 α -F₁-ATPase (Senior, 1988) および TIM10 (Sirrenberg et al., 1998)、ヘム代謝の ALAD (Jaffe, 2000)、糖代謝の LDHB (Place and Powers, 1979)、細胞内輸送の Rab-1c (Allan et al., 2000) および免疫系の I κ B α (Baeuerle and Henkel, 1994) が含まれた。免疫系と温度適応との關連は以前から指摘されており (Kikuchi et al., 1995; Anderson and Srivastava, 1999; Magnadóttir et al., 1999)、鉄代謝と温度適応の關連についての報告も複数ある (Kikuchi et al., 1995; Yamashita et al., 1996; Hirayama et al., 2004)。

温度馴化に際して、変温動物は生理機能を維持するため細胞膜の生化学的改変を行う (Hazel, 1995)。Rab タンパク質はエンドサイトーシス、エンドソーム融合、エクソサイトーシス、および細胞内輸送など様々な細胞内反応を制御する G タンパク質の 1 種である (Zerial and McBride, 2001; Seachrist and Ferguson, 2003)。その中、Rab-1 は小胞体とゴルジ体間の細胞内物質輸送を制御する (Allan et al., 2000)。Rab-1c は、Rab ファミリーの 1 つで、その mRNA 蓄積量は Fig.1-7 に示すように北日本および東韓集団由来のそれぞれ OLHNI-1 および OLSOK-e7 株では 33°C 培養区に比べて 15°C 培養区で大きかった。一方、南日本集団由来 OLHdrR-e3 株では両温度間で差はみられなかった。OLHNI-1 および OLSOK-e7 株は 15°C で増殖可能で、OLHdrR-e3 株は同温度で増殖できなかった。したがって、Rab-1c タンパク質はこの温度で細胞内輸送の促進に重要であることが示唆される。

NF κ B は様々な刺激に対する炎症反応において、中心的役割を担う最も重要な転写因子の 1 つである (Baeuerle and Henkel, 1994)。NF κ B はまた、細胞接着 (May and Ghosh, 1998)、細胞成長 (Chen et al., 2001) およびアポトーシス (Ghosh et al., 1998) に關わる遺伝子の誘導をも制御する。NF κ B は通常、I κ B α を含む inhibitor of nuclear factor κ B (I κ B) タンパク質ファミリーに結合して細胞質内に存在してい

る (May and Ghosh, 1998)。I κ B が I κ B kinase (IKK) によりリン酸化されてユビキチンが付加し、プロテアソームを介した分解が行われると、遊離した NF κ B が核に移行し、tumor necrosis factor (TNF) α などの関連遺伝子の発現調節を行う (Rothwarf and Karin, 1999)。さらに、患者や実験対象の哺乳類の体温を低く維持する疾病、すなわち低体温症では I κ B α のリン酸化やこの反応を触媒する IKK のリン酸化が抑制され、NF κ B の DNA への結合および TNF α などを転写する活性が減少する (Han et al., 2003)。本研究では *Rab-1c* の場合と同様に、北日本および東韓集団由来のそれぞれ OLHNI-1 および OLSOK-e7 株では 15°C で I κ B α mRNA 蓄積量が増大した。

なお、前述のように I κ B α がリン酸化後に分解されると NF κ B が核内へ移行し、特定の遺伝子の転写を活性化するが、その被調節遺伝子として I κ B α も含まれ、負のフィードバック機構が成り立っている (Ghosh et al., 1998)。I κ B α の転写産物量の増大は NF κ B の転写活性の増大を意味し、それに伴って細胞接着因子や増殖に関わる遺伝子の転写が行われる。前述のように北日本および東韓集団由来のそれぞれ OLHNI-1 および OLSOK-e7 株では 15°C で顕著な細胞数の増大がみられ、これらの代謝機構が十分に行われていることが示唆される。一方、南日本集団由来 OLHdrR-e3 株では 15°C で NF κ B が活性化されておらず、この温度で増殖できないのかも知れない。

第2章 ESTライブラリーを用いたメダカ cDNA マイクロアレイの構築

メダカでは Mitani et al. (2004) により EST ライブラリーが構築され、またそのデータベースが存在する。EST ライブラリーおよびデータベースは、メダカの cDNA マイクロアレイを構築するにあたり、非常に有用なツールである。ここで EST データベースが構築される元となった EST ライブラリーは、1) 北日本集団由来近交系 HNI の雌雄成体の全組織由来 RNA から作製した OLa ライブラリー、2) 同培養細胞 OLHNI-1 株由来 RNA から作製した OLb ライブラリー、3) UV 照射 OLHNI-1 株由来 RNA から作製した OLc ライブラリー、4) HNI 系統の卵巣由来 RNA から作製した OLd ライブラリー、5) HNI 系統の雌雄成体の肝臓由来 RNA から作製した OLe ライブラリー、6) γ 線照射 OLHNI-1 株由来 RNA から作製した OLf ライブラリー、7) 南日本集団 (岡山県野生集団) 眼由来 RNA から作製した SNK01 ライブラリー、8) 南日本集団由来近交系 HdrR のステージ 20-25 胚体由来 RNA から作製した MF01SSA ライブラリー、および 9) 南日本集団由来系統 CAB のステージ 24 胚体由来 RNA から作製した CAB ライブラリー、からなる。作製された EST ライブラリーは 96 穴プレートで -80°C 保存されている。なお、そのライブラリーとプレート内の位置からクローン名が決定されており、例えば OLa ライブラリーの 96 穴プレート 1 枚目の 2 列 c 行に位置するクローンは OLa01.02c と名付けられている。1 つのクローンにつき 1 つの cDNA がコードされるが、EST 解析では発現している遺伝子が無作為に選出してクローン化していることから、遺伝子の発現量 (mRNA 蓄積量) 依存的に数が決定されている。つまり発現量の多い遺伝子の配列をコードするクローンが同一ライブラリー中に多数存在することになる。効率よく多数の cDNA について発現解析を行うには、これに起因する同一配列の重複を除かなければならない。そこで、本章第 1 節では EST データベース上で同一配列を有するクローンからクラスターを作製したデータ OLeStall0309asm を基に、各クラスターにつき 1 クローンずつ選出して、同一配列の重複選択を最小限に抑えた。また第 2 節では、多くの遺伝子について再現よい結果を得るために、スライドグラス上にプローブ

を固定化する条件を検討した。

第1節 EST データベースを利用した cDNA クローンの選出

Mitani et al. (2004) により構築されたメダカ EST ライブラリーは、東京大学大学院新領域創成科学研究科および東京大学大学院理学系研究科で保存されている。本節では東京大学大学院新領域創成科学研究科に保存してある OLa、OLb、OLc、OLD、OLE および OLf ライブラリーの利用を検討した。各ライブラリーにつき、それぞれ 1,668、2,202、2,272、3,453、1,261 および 1,663 クローンの末端配列が EST データベースに登録されている。しかしながら、これらの cDNA ライブラリーには遺伝子の重複がみられる。また、cDNA マイクロアレイの1枚のスライドグラスに固定化できる遺伝子の数には限りがある。効率的な解析を行うため、EST データベースのスクリーニングで、同じ配列をもつ cDNA クローンにより作製されたクラスター1つにつき1クローンずつ選出する方法を試みた。

また、近年、遺伝子の機能解析や発現解析に Gene Ontology (GO) が用いられている (Gracey et al., 2004)。GO とは、生物種によって記載様式の異なる遺伝子情報を共通の概念で整理したものである (The Gene Ontology Consortium, 2000)

(the Gene Ontology Database: <http://www.geneontology.org/>)。GO は共通概念を構造化した部分の ontology と各生物種の遺伝子部分の annotation からなり、Ontology と annotation は GO identifier (GO-ID) で相互にリンクしている。GO の ontology 部分は molecular function、biological process および cellular component の3つの成分からなり、それぞれ単独分子の作用である機能、複数分子の作用である機能、および細胞での遺伝子産物の局在について示す。なお、GO の ontology 部分は GO-ID の階層構造で示すことができ、概念を表す GO term (以下 GO 項目) とともに表されることが多い。例えばラット *Rattus norvegicus* の eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 遺伝子 (*EEF1A1*) は GO:0003677、GO:0005853 および GO:0016564 を ID にもち、これら3つの GO-ID はそれぞれ GO 項目 DNA binding、eukaryotic translation elongation factor 1 complex、および transcription repressor activity に対応する。このうち GO:0003677 (DNA binding) および GO:0016564 (transcriptional repressor activity) は molecular function に含まれ、

GO:0005853 (eukaryotic translation elongation factor 1 complex) は cellular component に含まれる。さらに、GO:0003677 (DNA binding) は、GO:0003674

(molecular_function)、GO:0005488 (binding) および GO:0003676 (nucleic acid binding) の階層構造で表される。各 GO-ID の階層構造の大きさは様々であるが、本研究では広範な視点での解析を行うため、高次の階層の GO 項目に含まれるクローンの数を調べ、そのクローン数に各ライブラリー間で差があるかどうかを調べた。

方 法

EST クローンの確認

まず、各ライブラリーより無作為にクローンを選出し、そのライブラリーの内容を PCR 増幅産物の電気泳動像により判断した。なお、PCR、増幅産物の電気泳動および染色は第 1 章第 2 節と同様の方法で行った。ただし、PCR のプライマーは、pME13s をベクターとする北日本集団由来近交系 HNI の雌雄成体の全組織由来 RNA から作製した OLa ライブラリーでは pME18s 5' primer

(5'-CTTCTGCTCTAAAAGCTGCG-3') および pME18s 3' adaptor primer

(5'-AACAAAGGCCGACTCGACTCGATCC-3') を用いた。また、pBluescript SK+ をベクターとする同近交系から樹立した培養細胞 OLHNI-1 株および γ 線照射 OLHNI-1 株由来 RNA からそれぞれ作製した OLb および OLf ライブラリーでは SK primer (5'-CGCTCTAGAACTAGTGGATCC-3') および T7 primer

(5'-GTAATACGACTCACTATAGGGC-3') を用いた。さらに、pUC118 をベクターとする UV 照射 OLHNI-1 株、HNI 系統の卵巣および肝臓由来 RNA からそれぞれ作製した OLe、OLd および OLe ライブラリーについては Best M13 primer s20

(5'-CGACGTTGTAACGACGGCCAGT-3') および Best M13 primer RV-P

(5'-GGAAACAGCTATGACCATGATTAC-3') を用いた。

EST クローンの選出

cDNA マイクロアレイを作製する際に用いる cDNA クローンは、各 EST ライブラリーのデータベースを含む MEBase を対象に *in silico* スクリーニングした。まず、メダカ EST データベース中、東京大学大学院新領域創成科学研究科に保存されている OLB ライブラリーのクラスター検索を行い、各クラスターの中で、最長配列を選択した。順次、OLC、OLD、OLE および OLF ライブラリーについても同様に cDNA クロンを選択した。

さらに、上記の EST ライブラリーから選択した cDNA クローンを各 70 μ l LB 培地を含む 96 穴プレートに植え継ぎ、37°C で 1 晩インキュベートした。さらに、20% (v/v) グリセロールを含む LB 培地を等量、各ウェルに添加し cDNA マイクロアレイ用メダカ EST (MEST) ライブラリーを作製した。MEST ライブラリーは使用まで -80°C で保存した。

メダカゲノムデータベースを利用した相同遺伝子の検索

メダカ EST データベース上で塩基配列のみが登録されており、相同遺伝子が同定されていないものについて、whole genome shotgun (WGS) メダカゲノムデータベース (<http://dolphin.lab.nig.ac.jp/medaka/>) から相同領域を検索し、その中、E value が e^{-10} 以下で最小値を示す scaffold を選抜した。この配列につき、GENSCAN (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>) による遺伝子コード領域の予測を行い、得られた相同領域の演繹アミノ酸配列を BLAST search に付した。アミノ酸同一率が 30% 以上の配列を選抜し、その中で、GO データが記載されているヒト、マウスおよびラット由来の配列が含まれた場合はそのいずれかの配列を、また、これら 3 生物種のもが含まれない場合は、アミノ酸同一率が最も高い生物種のもを相同遺伝子とした。

Gene Ontology 項目による選出クローンの機能分類

相同遺伝子が明らかなクローンにつき、GenBank から各クローンの GO-ID を検索して、選出したクローンを各ライブラリーごとに GO 項目で分類した。

結 果

ライブラリーの cDNA クローン解析

各ライブラリーにつき PCR による挿入配列の増幅を試みた。その結果、Fig. 2-1 のように、OLa ライブラリーではいくつかのクローンで複数の増幅産物がみられた。その他の各ライブラリーについても同様に一部のクローンで複数の増幅産物がみられたが、OLa ライブラリーと比べてその頻度は少なかった。

in silico スクリーニング

上記のように OLa ライブラリーではいくつかのクローンで複数の PCR 産物が検出されたため、以後の EST クローンの選出は OLb、OLc、OLd、OLe および OLf ライブラリーに限って行った。方法に記載した方法で 1 クラスターにつき 1 クローンずつ選択し、OLb、OLc、OLd、OLe および OLf ライブラリーからそれぞれ、1,233、268、1,549、325 および 174 クローン、計 3,549 クローンが選出された (Table 2-1)。MEST ライブラリーは合計で 96 穴プレート 37 枚分となった。 -80°C 保存 EST ライブラリーからクローンを LB 培地に植え継いで 1 晩培養した際、クローンの増殖がみられないものもいくつかみられ、これらについては以後の解析で区別した。

Gene Ontology 項目による機能分類

選出した各ライブラリー由来のクローンのうち、EST ライブラリー上で相同遺伝子が示されているものについてその GO 項目による機能分類に供したところ、いくつかの GO 項目でライブラリーにより含まれるクローンの割合が異なっていた (Supplementary Table 2-1)。すなわち、メダカ成魚の肝臓由来 OLe ライブラリーには GO 項目の molecular function に属する transcription regulator activity に関与するクローンが、また、 γ 線照射 OLHNI-1 株由来 OLf ライブラリーには molecular function に属する enzyme regulator activity に関与するクローンが含まれていなかった。さらに、GO 項目の cellular component に属する extracellular のク

ローン数は OLe および OLf ライブラリーで多く、cellular component のクローン数に対する extracellular のクローン数の割合をみたところ、OLb、OLc、Old および OLf ライブラリーではそれぞれ 0.08、0.06、0.06 および 0.17 であったが、OLe ライブラリーでは 0.32 と高かった。

第2節 メダカ cDNA マイクロアレイの構築

cDNA マイクロアレイ実験ではまず、目的の生体組織から抽出した全 RNA または mRNA を対象に蛍光標識した cDNA を合成する。この標識された cDNA 試料プローブを、EST ライブラリーからの 1 本鎖 cDNA が固定されたスライドガラスに対してハイブリダイズする。サザンブロットやノザンブロットのような一般的なハイブリダイゼーションと同様に、試料プローブは相補的なプローブとのみ反応する。固定プローブと試料プローブのハイブリダイゼーションには通常数時間以上を要する。その後、ハイブリダイズしていない試料プローブを洗い流し、マイクロアレイスライドガラスをレーザー光に当て、レーザー共焦点顕微鏡を改良したスキャナーにより、スライドガラス上のそれぞれの特異的 cDNA に対応したスポットの蛍光強度をスキャン画像として記録する。

スポッティング法による DNA の固定は、スライドガラス基板表面のプラス電荷と DNA が持つマイナス電荷との間のイオン結合を通じて行う。この方法では、ハイブリダイゼーション時に試料プローブが非特異的に基板表面のプラス電荷によって吸着して蛍光像のバックグラウンドが高くなり、微弱な試料プローブと固定プローブの反応によって得られる蛍光が検出できなくなる恐れがある。そのため、いくつかの化学的コーティングがなされたスライドガラスが市販されており、目的に応じて蛍光およびバックグラウンドの強度がふさわしいものを選択できる。

本節では前節で選出した EST クローンの PCR 増幅を行い、この増幅産物を対象にマイクロアレイ作製に用いるスライドガラスおよび DNA 溶解液の検討を行った。

方 法

PCR および増幅産物の精製

選択した EST クローンにつき、前節と同様の方法で PCR を行い挿入 cDNA 断

片を増幅した。さらに、PCR 産物から Montage™ PCR96 clean-up kit (Millipore, MA, USA) を用いて夾雑物を除いた。操作は付属の説明書に従って行った。

cDNA マイクロアレイに用いるスライドガラスおよび DNA 溶解液の検討

cDNA マイクロアレイを作製するに当たり、PCR 産物と混合する DNA 溶解液および DNA を固定するスライドガラスを検討した。すなわち、スライドガラスとして MATSUNAMI 社 (Osaka, Japan) 製の APS コート、poly-L-lysine コート、高密度化アミノ基導入、および DMSO 対応高密度化アミノ基導入の計 4 タイプを供試した。さらに、スライドガラスに DNA を固定する際の溶解液として、MATSUNAMI 社製 Spotting Solution、50% DMSO、および Spotting Solution と 50% DMSO を 1:1 に混合した溶液を検討した。滅菌水で平均 100 pmol/μl となるよう調製した精製 PCR 産物の一部 (Supplementary Table 2-2) に等量のいずれかの DNA 溶解液を加えて混合した後、Affimetrix 417 Arrayer (Affimetrix, CA, USA) を用いて各スライドガラスに固定プローブとなる PCR 産物をスポットした。

cDNA マイクロアレイスライドガラスの前処理

スポット後のスライドガラスは 80°C で 1 時間処理した後、60 mJ の UV を照射した。次に、3.2 g の無水コハク酸を 200 ml の 1-methyl-2-pyrrolidinone に溶解した液に 22 ml の 1.0 M Na-borate 溶液を使用直前に加えてスライドガラスを浸し、3 分間に 1 回、3 度上下に揺動させながら 20 分間処理した。次に超純水に浸し 10 回揺動する操作を 3 回繰り返した。さらに、95°C 以上の超純水に 2 分間浸し、4°C の 100% エタノールに 1 分間浸して脱水した。処理したスライドガラスは暗所にて乾燥し、乾燥機内で使用まで遮光して保存した。

メダカ cDNA マイクロアレイの構築

上記予備実験により選択されたスライドガラスおよび DNA 溶解液を用い、メダカ各クローンの PCR 産物を 2 ヶ所ずつ、Affimetrix 417 Arrayer (Affimetrix) を用いて 1 枚のスライドガラス上にスポットした。さらに、内部標準として段

階希釈した EST クローン OLe06.11c 由来 *EF-1 α* cDNA およびネガティブコントロールとして Lucidea™ Universal ScoreCard™ (Amersham Biosciences, NJ, USA) の人工 DNA をスポットし、計 7,680 スポットを含む cDNA マイクロアレイを製作した。

蛍光標識 cDNA プロープの作製

北日本集団由来 OLHNI-1 株を 33°C で培養し、コンフルエント状態の細胞から第 1 章第 2 節と同様に全 RNA を抽出し、ただし最終溶解量は 20 μ l とした。Cy3 および Cy5 標識 cDNA の作製は、上記の全 RNA を鋳型に CyScribe first-strand cDNA labelling kit (Amersham Biosciences) を用い、付属の説明書に従って行った。すなわち、全 RNA 15 μ g にキット付属の random nonamer 1 μ l および anchored oligo(dT) を 3 μ l 加え、全量を 11 μ l として静かに混合した。70°C、5 分間インキュベートした後、室温で 10 分放置しプライマーを mRNA にアニールさせた。その後、キット付属 5 x CyScribe buffer 4 μ l、0.1 M dithiothreitol (DTT) 2 μ l、nucleotide mix 1 μ l、CyDye 標識 dCTP 1 μ l および CyScribe reverse transcriptase 1 μ l を加え、20 μ l とした。ピペティングで静かに混合した後、42°C でインキュベートし、90 分後に 2.5 M NaOH 2 μ l を加えた。さらに、攪拌後、37°C、15 分間インキュベートして逆転写反応を停止した後、2 M HEPES 10 μ l で中和して CyDye 標識 cDNA を作製した。また、蛍光標識 cDNA プロープの作製には蛍光強度を増大させるために、上記キットとは別途、CyScribe post-labelling kit (Amersham Bioscience) も用いた。また、このとき、25°C で継代培養した北日本集団由来 OLHNI-e1 株から抽出した全 RNA を鋳型に用いた。この場合、CyDye 標識 dCTP の代わりにアミノアシル標識 dUTP 1 μ l を用いて逆転写した。2 M HEPES による中和操作の後、3 μ l の 3 M sodium acetate および 105 μ l の 100%エタノールを加えた。十分混合した後、-80°C で 30 分間放置し、13,000 x g、30 分間遠心分離に付した。遠心後の上清を除去し、70%エタノールを加えた。再度 13,000 x g で 15 分間の遠心分離後の上清を除去し、室温で軽く乾燥させた後、40 μ l の 0.1 M sodium bicarbonate buffer (pH9.0) に再懸濁した。さらにキット付属の CyDye

N-hydroxysuccinimide (NHS) ester 粉末を加え、よく混合後、2 時間暗所で保持した。その後、15 μ l の 4 M hydroxylamine を加え、懸濁後さらに 15 分間反応させた。CyDye 標識した cDNA は GFX purification kit (Amersham Biosciences) を用いて付属の説明書に従って精製し、異なる CyDye で蛍光標識した試料プローブを混合して遠心乾燥機にて乾燥した。

ハイブリダイゼーション

蛍光標識した試料プローブを 6 μ l の滅菌水にて再懸濁後、96°C で 2 分間熱変性させ、氷冷後 100 μ g/ μ l の poly(A)80 を 1.5 μ l 添加し、75°C で 45 分間インキュベートした。さらにキット付属のハイブリダイゼーション溶液を 7.5 μ l およびホルムアミドを 15 μ l 加え、先に作製した cDNA マイクロアレイに添加して 65 °C で 18 時間ハイブリダイズした。

洗浄はまず、0.2% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS) を含む 2 x standard saline citrate (SSC) (33.3 mM NaCl を含む 33.3 mM sodium citrate) 溶液中にマイクロアレイスライドガラスを浸してカバーガラスを除去し、同組成の溶液を用いて、1 分間毎に 3 回上下に揺動させながら室温で 3 分間洗浄する操作を 3 回繰り返した。次に、0.2% SDS を含む 0.2 x SSC 溶液を用いて、前述の操作を繰り返した。さらに、60°C の同溶液で 2 分間毎に 3 回上下させながら 10 分間洗浄する操作を 2 回繰り返した。次に、室温で同溶液で 1 分間毎に 3 回上下揺動する洗浄を 3 分間ずつ 2 回行い、0.2 x SSC 溶液で 10 回揺動して洗浄する操作を 3 回繰り返した。最後に、100%エタノールで 20 回揺動する洗浄を 2 回繰り返した。洗浄したスライドガラスは 800 x g で 3 分間遠心して乾燥した。

ScanArray 4000 による蛍光像の取り込み

洗浄後のスライドガラスにつき、ScanArray 4000 (GSI Lumonics, MA, USA) を用い、レーザー強度を 100% とし、蛍光強度が測定可能な上限値を越えないよう光電子増倍管 photomultiplier tube (PMT) の増幅率を自動調節して蛍光像を取り込んだ。

QuantArray による蛍光強度の取得

ScanArray 4000 で取り込んだ蛍光像をデータ取得プログラムである QuantArray (GSI Lumonics) に供して Cy3 および Cy5 の蛍光強度をヒストグラム方式で取得した。すなわち、各スポットに対応する解析エリア内の蛍光強度をその中で最も強い蛍光強度を 100 としたヒストグラムで表わし、その 80-95% および 5-20% の値をそれぞれスポット蛍光強度およびバックグラウンドとし、前者から後者の値を減算して当該蛍光強度とした。また、各スポットの強さを目視観察し、本来の蛍光とは異なる蛍光がみられた場合、以下の解析から除去した。両 CyDye の蛍光強度は scatter plot で比較した。

結 果

スライドガラスおよび DNA 溶解液の検討

cDNA マイクロアレイ作製時のスライドガラスおよび DNA 溶解液の検討には固定するプローブとしてメダカ EST ライブラリーから PCR で増幅した 48 個の cDNA 断片を用いた (Supplementary Table 2-2)。一方、試料プローブには 33°C で培養した北日本集団由来 OLHNI-1 株の細胞から調製した蛍光標識 cDNA を用いた。MATSUNAMI 社製 Spotting Solution、50% DMSO、および Spotting Solution と 50% DMSO を 1:1 に混合した溶液を DNA 溶液として、APS コート、poly-L-lysine コート、高密度化アミノ基導入、および DMSO 対応高密度化アミノ基導入の 4 種のスライドガラスに供してハイブリダイゼーションを行い蛍光像を調べた。その結果は Fig.2-2 に示されるように、APS コートスライドガラスでは蛍光が認められなかった。次に、蛍光が認められたスライドガラスにつき、上記 3 種の DNA 溶液のスポット群の形状を比べたところ、DMSO 対応高密度化アミノ基導入スライドガラスおよび 50% DMSO の DNA 溶解液を用いた場合の組み合わせで蛍光像が最も面積が広く、均一であることが示された (Fig. 2-2)。したがって、以下の cDNA マイクロアレイの構築は、この組み合わせで行うこ

とした。

Scatter plot による CyDye 間の蛍光強度の比較

EST ライブラリーから得た 48 プローブに対する蛍光強度を、同一の試料 cDNA につき Cy3 および Cy5 で蛍光標識したときの蛍光強度の関係を scatter plot により比較した。その結果、全てのプローブで Cy3 および Cy5 蛍光プローブの蛍光強度はほぼ 1:1 となり (Fig. 2-3)、試料内 mRNA の存在比をよく反映することが明らかとなった。

cDNA マイクロアレイの構築とその確認

メダカ EST 各クローンのプローブにつき 2 スポットずつ、また内部標準およびネガティブコントロールを加えて 7,680 スポットを含む cDNA マイクロアレイを構築し、北日本集団 OLHNI-e1 株の細胞から調製した Cy3 蛍光プローブをハイブリダイゼーションさせたときの蛍光像を Fig.2-4 に示す。アレイブロックが 8 個みられるが、7,680 スポットは 8 個のブロックに分布する。スポットに用いた Affimetrix 417 Arrayer (Affimetrix) は 4 つのピンで DNA をスポットすることから、4 ブロックが 1 つの DNA セットになる (Supplementary Fig. 2-2)。各スポットは Fig. 2-4B に示されるように均一な蛍光強度がみられた。各ブロックの中央 4 箇所位置する未反応の領域は市販のネガティブコントロールが位置し、その右側に段階希釈した内部標準 *EF-1 α* の蛍光反応がみられた。また、各ブロックの上部および右下部に位置する、北日本集団由来 OLHNI-1 株由来 RNA から構築された OLb、OLc および Olf ライブラリーのクローンを含むスポットで強い蛍光がみられるものが多かった (Supplementary Fig. 2-2)。一方、それ以外の部分に位置する、北日本集団 HNI 近交系の卵巣および肝臓由来 RNA から構築されたそれぞれ OId および OLe ライブラリーのクローンを含むスポットでは蛍光が弱いものが多かった。さらに、上側 4 ブロックと下側 4 ブロックに含まれる同じクローン由来のスポットでも蛍光強度の強弱がみられ、とくに上下方向の中央部に位置するスポット、および左右方向の末端部分に位置するスポット

でその差が顕著にみられ、スライドガラス上のスポット位置によって蛍光強度が異なることが明らかとなった。

第3節 考 察

本章においては、メダカ EST 各ライブラリーを用い、一枚のスライドグラス上に7,680スポットを含むcDNAマイクロアレイを構築した。各クローンにつき、EST ライブラリー上で相同遺伝子が示されているものを GO 項目分類の検索に供したところ、いくつかの GO 項目でライブラリーによって含まれるクローンの割合が異なっていた (Supplementary Table 2-1)。これは組織や細胞の状態によって mRNA の組成が異なり、これがライブラリーを反映していることを示唆する。実際、HNI近交系の肝臓由来 RNA から構築された OLe ライブラリーで cellular component に属する extracellular のクローン数が多かったが、肝臓で特異的に発現する hemopexin 遺伝子 (Hirayama et al., 2004) などの分泌性のタンパク質をコードするものが多いためであると予想される。なお、本研究においては EST ライブラリーの各クラスターに含まれる最長配列を意図的に選出していることから、その影響も考えられる。

Fig. 2-2 に示すように、プローブをスライドグラス上に固定する方法として、DMSO 対応高密度化アミノ基導入スライドグラスおよび 50% DMSO を DNA 溶解液に用いる組み合わせでスポットの最適の形状および大きさが得られた。DMSO 対応高密度化アミノ基導入スライドグラスは、APS コートや poly-L-lysine コートのスライドグラスと比較して正の電荷が強い。プローブ DNA のスライドグラス上への結合が増すが、同時に試料プローブの非特異的なスライドグラスへの結合も増え、バックグラウンドの蛍光強度が強くなる傾向があることが製造元 MATSUNAMI 社から指摘されている。本研究では無水コハク酸溶液の使用および適切な洗浄操作により、バックグラウンドの蛍光強度は低く抑えられ、プローブ特異的な強い蛍光強度が得られた。そこで、本スライドグラスを用いて Cy3 および Cy5 標識試料プローブを反応させて蛍光強度を scatter plot により比較した。その結果、蛍光が得られた全ての固定プローブの Cy3 および Cy5 の蛍光強度比はほぼ 1:1 となり、試料 mRNA の濃度をよく反映することが示され、本実験の再現性が高いことが明らかとなった。

Fig. 2-4 において、8 個のブロックのいずれにおいても上部に位置するプローブ由来の蛍光強度が強かったが、これはライブラリーの内容が関係しているものと考えられる。すなわち、強い蛍光がみられた各ブロック上部および右下部のプローブは、試料プローブで用いた北日本集団由来 OLHNI-e1 株と同じ HNI 近交系由来 OLHNI-1 株から構築された OLb、OLc および OLf ライブラリー由来の固定プローブであった。一方、北日本集団由来 HNI 近交系成魚の卵巣および肝臓から構築されたそれぞれ OLd および OLe ライブラリー由来の固定プローブではシグナルが得られないものが多く、これらは由来する組織に特異的な遺伝子をコードしていると考えられる。また、同じプローブでも、蛍光強度で強弱がみられたが、スライドガラス上の位置の影響や、ハイブリダイゼーション時の DNA 溶液の浸透状況に由来することなどが考えられる。本研究ではこれを考慮し、第 3 章における解析では、同一プローブの 2 つのスポットの中、片方の蛍光のみでも解析に供した。

第3章 cDNA マイクロアレイを用いた温度適応関連遺伝子の網羅的探索

1990年代後半にマイクロアレイ技術が開発されて以来、何千という遺伝子の発現量の変化を同時にモニタリングすることが可能となり、酵母 *S. cerevisiae* やヒトをはじめ、様々な生物種における多様な遺伝子発現解析が行われている (DeRisi et al., 1997; Perou et al., 1999)。マイクロアレイを用いた初期解析のほとんどは、遺伝子発現の変化量に閾値を設定して、ある一定の変化量以上の遺伝子を対象とする解析方法がとられていた。しかしながら、生体内の生理作用は全て発現量が大きく変化する遺伝子に依存して行われているわけではない。実際、Oleksiak et al. (2005) はマミチヨグの心筋の代謝活性は発現量が大きく変わる遺伝子ではなく、むしろ微妙に変化する遺伝子に依存している可能性を示している。

cDNA マイクロアレイは各 cDNA に相補的な mRNA の蓄積量を網羅的に解析する方法である。ここで、mRNA に関する実験では以下の注意が必要である。すなわち、mRNA は不安定な分子で、安定した細胞状態でも、各 mRNA に特異的な速度で分解される。mRNA が転写されてから分解されるまでの寿命は、転写の速度、転写後の安定性などが関係して非常に複雑である。mRNA 蓄積量は新たに転写される mRNA 量で維持される。cDNA マイクロアレイで得られる遺伝子発現データは、各 mRNA 蓄積量のある時点における他の試料中の蓄積量との相対値として得られる。mRNA 蓄積量はそのまま翻訳量に比例するとは限らない。細胞の機能の大部分をタンパク質が担っているが、タンパク質の寿命は mRNA のそれと同様にさまざまである。したがって、mRNA 蓄積量は、翻訳されるタンパク質の濃度と対応していない場合がある。これらの点を考慮し、cDNA マイクロアレイにより得られた膨大なデータを解析する必要がある。

さらに、cDNA マイクロアレイの結果を考える際に、偽陽性または偽陰性の遺伝子を考慮する必要がある。偽陽性の遺伝子とは実際の遺伝子発現では変化がないにもかかわらず、データ解析において有意と判定される遺伝子を指す (Kohane et al., 2004)。一方、偽陰性の遺伝子とはその逆の結果を示す遺伝子で

ある。

近年、マイクロアレイを用いた魚類温度適応に関する報告がみられる。Gracey et al. (2004) は広温域性魚類のコイを対象に低温馴化に伴う各組織の遺伝子発現を cDNA マイクロアレイにより調べた。その結果、各組織に共通して低温で mRNA 蓄積量が増大する遺伝子がみられた。また、組織特異的な発現パターンを示す遺伝子が多く観察され、低温馴化に伴って生体内で遺伝子発現の大規模な改変が行われていることが示された。本章では、メダカの細胞レベルでの温度依存的な応答を明らかにするため、北日本および南日本集団由来のそれぞれ OLHNI-e1 および OLHDrR-e3 株につき、培養温度の変化に伴う経時的な mRNA 蓄積量の変化を網羅的に解析した。

第 1 節 北日本集団由来培養細胞を対象とした温度移行に伴う経時的な遺伝子 発現プロファイルの作成

cDNA マイクロアレイ実験の多くは対照群に対して実験群を比較する *reference design* が用いられる。本法は対照群の cDNA を常に同じ蛍光色素で標識し、実験群の cDNA をもう 1 つの蛍光色素で標識して両者の間でハイブリダイゼーションを行う。しかしながら、ある片方の蛍光標識物質で蛍光強度が高く出る塩基配列が知られており (Kerr and Churchill, 2001)、この場合、偽陽性の結果となる。さらに、*reference design* では全てのアレイで対照群を設定することとなり、実験群の情報以上に対照群の情報が収集されてしまうといった無駄が生ずる。本研究ではデータの信頼性の向上およびコスト削減のため *loop design* を採用した (Kerr and Churchill, 2001; Kerr, 2003)。本法は実験群と対照群を比較するのではなく、実験群間で比較する方法で、実験群の情報量を得るのに必要なマイクロアレイスライドガラスの枚数は *reference design* と比べて半分で済む。また、*loop design* は実験群間で偏りなく比較することで、スライドガラス、蛍光色素、スポット、試料プローブ間の差が考慮され、再現性の高い解析結果が得られる (Kerr and Churchill, 2001)。一方、*reference design* では試料数によらず、実験群と対照群を直接比較するのに対し、*loop design* では間接的に比較しなければならない実験群が試料数に比例して多く生じる。*loop design* を用いた比較では、実験群数は 10 群未満が推奨される (Kerr and Churchill, 2001)。

前章で示したように、メダカ各 OL ライブラリーから選出した全てのクローンにつき、GO 項目で機能分類したところ、ライブラリー間でクローンの割合に差のある GO 項目がみられた (Supplementary Table 2-1)。また、ハイブリダイゼーションの結果では、ライブラリー間で蛍光が得られた固定プローブ種に差が認められた (Fig. 2-4)。したがって、以下の実験ではスポットした固定プローブ全体ではなく、蛍光が得られた固定プローブについてのみ比較解析した。

第 1 章では 27°C で飼育した各メダカから尾鰭または胚体を採取し、33°C で培養して細胞株を樹立したことで、この温度を基本に細胞を種々の温度へ移行さ

せて実験を行った。なお、この温度は培養細胞の増殖に最適であることが示されている (Arai et al., 1994)。しかしながら、経験的に 33°C ではメダカ個体を正常な健康状態に長期間維持することは難しいとされている。したがって、本研究の成果を将来的にメダカ個体へ応用することを考慮し、メダカ個体の最適飼育温度付近である 25°C にて培養細胞を継代し、この温度から高温側の 33°C または低温側の 15°C への移行実験を行い、遺伝子発現プロファイルを比較した。なお、第 1 章第 1 節に示したように、北日本集団由来 OLHNI-1 株では 25°C でも細胞の凝集のためにコンフルエント状態には達せず、15°C 以下の培養では細胞の凝集が著しかった (Fig. 1-4A)。そこで本章では、15°C で顕著な増殖がみられ、OLHNI-1 株と同じ北日本集団 HNI 近交系由来細胞であり、OLHdrR-e3 株と同様に胚体から樹立された OLHNI-e1 株を試料とした。

方 法

細胞の温度移行実験

細胞増殖率の測定に当たっては、北日本集団由来 OLHNI-e1 株を 25°C から 15°C へ温度移行して経時的に細胞数を計測した。すなわち、1 ヶ月以上 25°C で継代した OLHNI-e1 株を 2.0×10^5 個ずつ 10 cm² プレートに分取し、24 時間 25°C で培養してプレート底面へ接着させた。このプレートを 15°C の恒温槽に移した。細胞数の測定は第 1 章第 1 節と同様にして行った。なお、経時的に Olympus DP50 (Olympus) で細胞形態を観察した。

次に、試料プローブ用の細胞の調製に当たっては、OLHNI-e1 株を 25°C、75 cm² プレートで培養してコンフルエント状態にした。Fig. 3-1A に示すようにこの細胞を 33°C および 15°C に移行後 1、3、12 時間、1、3 および 7 日目に、25°C では 12 時間、1、3、7 日目に第 1 章第 2 節と同様の方法で全 RNA を抽出した。また、実験開始時の細胞からも同様に全 RNA を抽出した。

蛍光標識試料プローブの作製およびハイブリダイゼーション

CyDye 標識試料プローブの作製には CyScribe post-labelling kit (Amersham Bioscience) を用い、第 2 章第 2 節と同様の方法により行った。ハイブリダイゼーションは、Fig. 3-1B および C で示すように、loop design に従って Cy3 および Cy5 蛍光色素で標識した各実験群由来の試料プローブを混合して行った。ハイブリダイゼーションおよびマイクロアレイスライドの洗浄は第 2 章第 2 節と同様にして行った。

データの取得および解析

洗浄後のスライドガラスから ScanArray 4000 (GSI Lumonics) を用いて第 2 章第 2 節と同様の方法で蛍光像を取り込んだ。なお、PMT 増幅率を自動調節で蛍光像を取り込んだものを蛍光像 (1) とした。また、蛍光強度の低い遺伝子をも解析できるよう、同一スライドガラスにつき PMT 増幅率を自動調節時より 20% 高く設定して取り込んだものを蛍光像 (2) とした。

次に、ScanArray 4000 で取り込んだ蛍光像 (1) および (2) を、QuantArray に供して Cy3 および Cy5 両 Dye の蛍光強度をヒストグラム方式で取得した。また、各スポットの蛍光の強さおよび形状を目視観察し、均一な蛍光がスポット領域の半分以上みられないスポットおよび周辺に非特異的な蛍光がみられたスポットは、以下の解析から除いた。

各スライドガラスにつき、蛍光像 (2) 中、Lucidea™ Universal ScoreCard™ (Amersham Biosciences) のネガティブコントロールのスポットの中、Cy3 および Cy5 の蛍光強度の最も高いスポットの値をそれぞれ 2 倍して各 CyDye の閾値とした。両 Dye に由来する蛍光強度がいずれも閾値より低いプローブは以下の解析から除いた。解析可能な種々のプローブにつき、Cy3 および Cy5 の蛍光強度の比を計算し、その中央値で各プローブの値を補正した。なお、蛍光像 (2) は蛍光強度が測定可能な上限に達し、試料プローブ中の濃度差を反映していないスポットが数%程度含まれる。そこで蛍光像 (2) で蛍光強度が上限値に達しているスポットについては蛍光像 (1) での値を代用した。

統計解析

解析により得られた各 cDNA マイクロアレイのデータは、温度移行実験開始時の 25°C、0 時間の細胞の各遺伝子の mRNA 蓄積量を 1 とする相対値を算出しその \log_2 値で表した。1 枚のマイクロアレイスライドグラスには各プローブにつき 2 つスポットされているが、両スポットのいずれも解析可能であった場合は平均値を、また片方のみ解析可能であった場合はその値を採用した。Loop design に基づき、1 つの試料細胞区につき 4 アレイのデータを得た (Fig. 3-1B, C)。各温度で、異なる培養時間の細胞の mRNA 蓄積量を、全培養時間を通して統計解析するときは Kruskal-Wallis ANOVA を、また 2 つの培養時間の細胞で比較をするときは Mann-Whitney test を用いた。さらに、同じ細胞株で異なる培養温度の細胞間で mRNA 蓄積量を比較する場合、および異なる細胞株で同じ培養温度の細胞間で比較する場合も同様の方法で解析した。

GO 項目による分類

第 2 章第 2 節と同様に、EST データベース上で相同遺伝子が同定されているクローンにつき、GenBank データベースから各クローンが属する GO 項目を取得し、それらの分類を行った。

各実験群につき、解析可能であったクローン数 (G^{all}) に対する特定の GO 項目に属するクローン数 (T) の比を算出し、この比が、統計解析により有意差 ($P < 0.05$) のみられたクローン数 (g^{all}) に対する特定の GO 項目に属するクローン数 (t) の比と同じと仮定し、各 GO 項目に含まれるクローン数の期待値 E_t を次式で求めた。

$$E_t = g^{\text{all}} \times T / G^{\text{all}} \quad (1)$$

例えば、解析可能であったクローン数が 1,000 あり (G^{all})、その中、いずれかの GO 項目に属するクローン数が 600 で (T^{all})、特定の GO 項目に属するクローンが 300 (T) とする。温度移行実験後、統計的に有意に mRNA 蓄積量に変化してい

たクローン数が 500 (g^{all}) であった場合、その中のいずれかの GO 項目に属すると期待されるクローン数は 300 (Et^{all})、特定の GO 項目に属すると期待されるクローン数は 150 (Et) となる。ここで、実際の観測値は期待値とは異なる場合がほとんどで、特定の GO 項目に属するクローンが、有意差のみられたクローンの中で有意に多いか否かを χ^2 検定により調べることになる。すなわち、有意差のみられたクローンの中、いずれかの GO 項目に属するクローン数の観測値 t^{all} と期待値 Et^{all} との割合と、特定の GO 項目に含まれる観測値 t と期待値 Et との割合が等しいとの帰無仮説を立てて χ^2 検定する。なお、本手法では自由度が 1 のため Yates の補正を適用し、以下の式で求めた。

$$\chi^2_{adj} = (|t^{all} - Et^{all}| - 0.5)^2 / Et^{all} + (|t - Et| - 0.5)^2 / Et \quad (2)$$

χ^2_{adj} の値から χ^2 分布表に基づいて P 値を求め、帰無仮説が棄却された場合、その GO 項目の遺伝子発現が有意に温度変化の影響を受けているものと判定する。ただし、 χ^2 検定で有意差がみられたものの期待値 Et が 2 に満たない GO 項目は Wickens (1989) の報告に従い信頼性が低いものと判断した。

結 果

北日本集団由来 OLHNI-e1 株を 25°C から 15°C へ温度移行したときの細胞数および形態の変化

25°C で継代した OLHNI-e1 株を 15°C へ温度移行後、経時的に細胞数を計測したところ、11 日目に細胞数は 2 倍以上に増大し (Fig. 3-2)、第 1 章第 1 節で示した 33°C で継代した細胞と同様の傾向 (Fig. 1-2) を示した。また、そのときの細胞形態を観察したところ、細胞はプレート底面に偏りなく分布しており、14 日目にコンフルエントに達していた (Fig. 3-3A)。

蛍光強度を取り込んだ遺伝子の解析

本研究では、プローブの一部は蛍光像のスポット形状やスポット周辺のバックグラウンドの高さなどから解析に供さなかった。また、蛍光強度が得られたプローブでも、片方の CyDye 標識では十分な蛍光強度が観察されているのにもかかわらず、もう一方の CyDye 標識では十分に得られていないものも多数みられた。ここで、補正前の各 CyDye 蛍光強度と補正後の Cy3/Cy5 標識蛍光強度比との関係を Fig. 3-4 に示す。両 Dye の蛍光強度とも閾値以下であったプローブは Cy3/Cy5 蛍光強度比が 1:1 より大きく離れているのがみられた。一方、片方の CyDye 蛍光強度のみが閾値以下であったプローブは、両 CyDye の蛍光強度がともに閾値以上であったプローブと同様に Cy3/Cy5 の蛍光強度比が 1:1 に近かった。したがって、両 CyDye の蛍光強度がともに閾値以下であったものは解析から除外した。

北日本集団由来 OLHNI-e1 株の 15、25 および 33°C における遺伝子発現プロファイルと GO による機能分類

種々の温度で培養した細胞の各 cDNA クローンの mRNA 蓄積量の経時的変化を Fig. 3-5 ~ 3-10 に、また、mRNA 蓄積量がいずれかの培養時間の間で有意差のみられたクローンの数と GO 項目を Table 3-1 および Supplementary Table 3-1、3-2 および 3-3 に示す。

まず、継代培養温度である 25°C では、実験 1 日目に採取した全 RNA から調製した cDNA プローブの蛍光取り込み量が非常に少なかったため、本試料を実験デザインから除外し (Fig. 3-1B)、温度移行前および移行後 12 時間、3 および 7 日目の試料を解析した (Fig. 3-5, 3-6)。いずれかの培養時間で統計解析により $P < 0.05$ で有意差のみられたクローン数は、解析可能であった 1,353 クローンのうち 263 クローンであった (Supplementary Table 3-1)。これら有意差のみられたクローンの中に、12 時間後に多くのクローンで mRNA 蓄積量の増減がみられた。その後、3 および 7 日目では mRNA 蓄積量の差がみられるものの、3 日目の傾向が 7 日目でも維持された。ANOVA で有意差のみられたクローンの数が期待値に

比べて有意に多いと χ^2 検定により判定された GO 項目は、molecular function に属する catalytic activity、cellular component に属する extracellular および biological process に属する development であり、development に属するものの中でもとくに morphogenesis で多かった (Table 3-1, Supplementary Table 3-1)。また、biological process の cellular process に属する cell communication で、7 日目における mRNA 蓄積量が $\log_2 \text{ratio} < -0.5$ と減少したクローンが多かった。一方、いずれかの培養時間の間で有意差の認められたクローンの中、molecular function に属する structural molecular activity、とくに structural constituent of ribosome に関与するクローン数は期待値と比べて有意に少なかった。

次に、25°C から 15°C に移行後、1、3、12 時間、1、3 および 7 日目の細胞については (Fig. 3-7, 3-8)、解析可能であったクローン数は 1,244 で、その中、348 クローンで統計解析により $P < 0.05$ で有意差がみられた (Supplementary Table 3-2)。これら有意差のみられたクローンでは移行 1 時間目に複数の遺伝子で mRNA 蓄積量の著しい減少を示した。減少のみられたクローンはその後 mRNA 蓄積量を増大させる傾向を示した。また、多くのクローンで 3 日および 7 日目にかけて mRNA 蓄積量が増大または減少していた。これらの有意差のみられたクローンは 25°C 培養で解析したクローンの場合と同様、様々な GO 項目に属していたが (Table 3-1, Supplementary Table 3-2)、 χ^2 検定により molecular function および biological process に属する多数の GO 項目のクローン数が有意に多かった。7 日目における mRNA 蓄積量が $\log_2 \text{ratio} < -0.5$ と減少したクローン中、molecular function の binding に属する nucleotide binding、同 catalytic activity に属する hydrolase activity のものが多くみられた。また、25°C 培養の場合と同様、7 日目で mRNA 蓄積量が $\log_2 \text{ratio} > 0.5$ と増大したクローンとして development に属する morphogenesis に関与するものが多く、また 15°C では cellular component に属する extracellular に関与するものも多くみられた。

次に、33°C で移行 1、3、12 時間、1、3 および 7 日目の培養細胞を解析した (Fig. 3-9, 3-10)。その結果、解析可能であったクローン数は 1,100 で、その中、 $P < 0.05$ で有意差がみられたものクローンは 153 であった。これらは 3 時間後に mRNA

蓄積量が大きく増大または減少した。興味深いことにその増大および減少傾向は移行3日目に逆転し、さらに7日目では3時間目と同様の傾向に復元した。これらのクローンは15および25°C培養細胞の場合と同様、様々なGO項目に属していたが(Supplementary Table 3-3)、 χ^2 検定で有意に異なると判定されたGO項目はmolecular functionに属するhydrolase activityのみで、7日目にmRNA蓄積量が $\log_2 \text{ratio} > 0.5$ と増大したクローンが多かった。

北日本集団由来 OLHNI-e1 株の 25°C および 15°C 培養細胞の mRNA 蓄積量の比較

OLHNI-e1 株の 25°C および 15°C 培養細胞で比較したところ、両培養群で解析可能であった 1,209 クローンの中、統計解析により 7 日目の mRNA 蓄積量が $P < 0.05$ で有意に変化していたものは 159 クローンであった(Supplementary Table 3-4)。これらは 7 日目の mRNA 蓄積量が 25°C と 15°C で逆転しているものが多くみられた(Fig. 3-11, 3-12)。Table 3-1 および Supplementary Table 3-4 に示す GO 項目の分類については、molecular function の catalytic activity に属する ligase activity、同 enzyme regulator activity などの酵素活性に関わるクローンの数で、25 および 15°C 培養細胞間で差がみられた。また、molecular function に属する binding、とくに nucleotide binding に関与するクローン、および biological process に属する cellular process および physiological process、とくに metabolism に関与するクローンは 15°C 培養細胞の 7 日目の mRNA 蓄積量が $\log_2 \text{ratio} < -0.5$ と減少したものとして 25°C 培養細胞に比べて多くみられた。また、molecular function に属する transporter activity および structural molecule activity に関わるクローンについては、15°C および 25°C 培養間で差がみられたものは少なかった。なお、これらのクローンの中、15°C 培養細胞の 7 日目の mRNA 蓄積量が 25°C 培養細胞の同日数後の mRNA 蓄積量に比べて有意に多いまたは少ない遺伝子の詳細をそれぞれ Table 3-2 および 3-3 に示す。15°C 培養細胞で mRNA 蓄積量が多かったクローンには collagen type II alpha 1 (COL2A1) や keratin 19 (KRT19) などの構造タンパク質をコードする遺伝子のほか、inhibitor of DNA binding 3 (ID3) や high mobility group box 1 (HMGB1) 遺伝子などの転写調節に関わるものがみられた。さらに、*I κ B α* (ま

たは *NFKB1A*) および NFκB/Rel ファミリーである avian reticuloendotheliosis viral (v-rel) oncogene related B 遺伝子 (*RELB*) の mRNA 蓄積量も 15°C 培養細胞で多く、興味深いことにこれらの 2 遺伝子の mRNA 蓄積量パターンはよく類似していた (Fig. 3-13)。また、15°C で少なかったクローンには H2A histone family member V (*H2AFV*) および X (*H2AFX*)、proliferation-associated 2G4 (*PA2G4*) 遺伝子など DNA 複製や細胞増殖に関与するものがみられた。

第2節 北日本および南日本集団由来培養細胞における温度依存的な遺伝子発現の比較

魚類の温度適応機構の解明に有効な方法の一つとして、近縁種や地域集団間を比較する方法があげられる (Oleksiak et al., 2002, 2005; Slechtova et al., 2004)。Oleksiak et al. (2002) はマミチョグを対象に cDNA マイクロアレイを用いてアメリカ Maine 州に生息する北方集団個体とアメリカ Georgia 州に生息する南方集団個体間の遺伝子発現を比較した。この結果、20°C で 6 ヶ月以上飼育したときの発現に有意差がみられた遺伝子が複数あることを示した。さらに Georgia 州に生息域をもつマミチョグ近縁種 *F. grandis* 個体の先述の遺伝子発現がマミチョグ南方集団個体のものと一致することを示した。このように、異なる環境下への遺伝子レベルでの適応が種を越えてみられることが示唆されている。

Supplementary Fig. 1-1 に示したようにメダカでも生息温度環境の異なる地域集団が存在する。さらに、各地域集団由来の近交系が作出されていることから、個体間の遺伝的多様性に起因する差を最小にすることができ、効果的に温度適応関連遺伝子の探索および解析が可能であると期待される。

本研究では細胞レベルで解析を行ってきた。第1章第1節において、北日本集団由来 OLHNI-e1 株および南日本集団由来 OLHDrR-e3 株を 33°C から 15°C へ温度移行したところ、OLHNI-e1 株は 11 日目の細胞数は温度移行前の 2 倍以上となった。一方、OLHDrR-e3 株では顕著な増殖はみられなかった。本節では 25°C で継代培養した両株を 15°C へ温度移行して遺伝子発現プロファイルを比較した。前節で OLHNI-e1 株を 25°C から 15°C へ温度移行したときでも 33°C から 15°C へ温度移行したときと同様に移行後 11 日目において実験開始時と比べて 2 倍以上の細胞数を示した。OLHDrR-e3 株についてもまず、25°C から 15°C へ移行したときの細胞数の計測を行った。さらに、同株につき、前節の OLHNI-e1 株の場合と同様の cDNA マイクロアレイ実験に供し、OLHNI-e1 株の結果と比較した。

方 法

細胞の温度移行実験

南日本集団由来 OLHdrR-e3 株を 25°C から 15°C へ温度移行し、前節の OLHNI-e1 株と同様の方法で経時的に細胞数の計測および細胞形態の観察を行った。

25°C および 15°C で培養した OLHdrR-e3 株につき、第 2 章第 3 節の方法に従い、25°C 培養細胞については実験開始後 0、12 時間、1、3 および 7 日目、また 15°C 培養細胞については温度移行後 3、12 時間、1、3 および 7 日目に細胞を採取して全 RNA を抽出した (Fig. 3-14A)。全 RNA を対象とした培養細胞の比較には loop design を用いた (Fig. 3-14B, C)。

cDNA マイクロアレイ解析

蛍光標識試料プローブの作製、ハイブリダイゼーション、蛍光像の取り込み、蛍光強度の取得、データ解析などは第 2 章第 2 節と同様の方法で行った。

結 果

南日本集団由来 OLHdrR-e3 株を 25°C から 15°C へ温度移行したときの細胞数および細胞形態の変化

25°C で継代した OLHdrR-e3 株を 15°C へ温度移行後、経時的に細胞数を計測したところ、第 1 章第 1 節での 33°C からの移行実験と同様に顕著な増殖はみられず (Fig.3-2)、北日本集団由来 OLHNI-e1 株の場合と異なった。また、細胞形態を観察したところ、OLHdrR-e3 株では細胞がプレート底面において局所的に分布し、細胞が低密度となっている領域が多くみられ、OLHNI-e1 の場合とは大きく異なることが明らかとなった (Fig. 3-3B)。

OLHdrR-e3 株の 25°C における遺伝子発現プロファイル

OLHdrR-e3 株の 25°C 培養細胞についての mRNA 蓄積量の経時的变化を Fig.

3-15 および 3-16 に示す。また、25°C 培養細胞につき、いずれかの培養時間の細胞間で有意差がみられたクローン数と GO 項目を Table 3-4 および Supplementary Table 3-5 に示す。

12 時間後に採取した試料の全 RNA から調製した cDNA プローブの蛍光取り込み量が非常に少なかったため、本試料を実験デザインから除いた (Fig. 3-14B)。0 および 1、3 および 7 日のいずれかの培養時間で統計解析により $P < 0.05$ で有意差のみられたクローン数は、解析可能であった 1,296 クローンの中 205 クローンであった (Supplementary Table 3-5)。これら有意差のみられたクローンの mRNA 蓄積量は培養中、徐々に増大または減少し (Fig. 3-15, 3-16)、増減がみられた前節の北日本集団由来 OLHNI-e1 株の場合とは異なった。これらのクローンは Supplementary Table 3-5 に示すように様々な GO 項目に属した。

χ^2 検定により、molecular function の catalytic activity に属する oxidoreductase activity および cellular component に属する extracellular につき 7 日目に mRNA 蓄積量が $\log_2 \text{ratio} > 0.5$ と増大するクローン数が期待値よりも有意に多いことがわかった。また molecular function の binding に属する nucleotide binding のクローン数が 7 日目の mRNA 蓄積量が $\log_2 \text{ratio} < -0.5$ と減少するものとして期待値よりも有意に多かった。また、OLHNI-e1 株の場合と同様、molecular function に属する structural molecule activity、とくに structural constituent of ribosome のクローン数は変化しているものが有意に少なかった。

OLHDrR-e3 株の 15°C における遺伝子発現プロファイル

15°C 処理細胞について、温度移行 7 日目に採取した RNA から調製した cDNA プローブの蛍光取り込み量が非常に少なかったため、本試料を実験デザインから除いた (Fig. 3-14C)。温度移行 0、3、12 時間、1 および 3 日目の各培養時間の細胞の mRNA 蓄積量を比較したところ、解析可能であったクローン数は 1,118 で、その中、統計解析により $P < 0.05$ で有意差がみられたものが 277 であった

(Supplementary Table 3-6)。これら有意差のみられたクローンの多くは 15°C 移行 3 日目に mRNA 蓄積量を大きく増大または減少させた (Fig. 3-17, 3-18)。

これらのクローンは 25°C 培養の場合と同様に、様々な GO 項目に属していたが (Table 3-4, Supplementary Table 3-6)、 χ^2 検定により、biological process の physiological process に属する response to stimulus に関与する多くのクローンが 15°C で発現変動しており、cellular component に属する extracellular と同様に、とくに 3 日目の mRNA 蓄積量が \log_2 ratio < -0.5 に減少するクローンの数が期待値よりも有意に多かった。

北日本集団由来 OLHNI-e1 株および南日本集団由来 OLHdrR-e3 株の 15°C における遺伝子発現プロファイルの比較

北日本集団由来 OLHNI-e1 株および南日本集団由来 OLHdrR-e3 株の 15°C 培養細胞の mRNA 蓄積量の経時的変化を比較して Fig. 3-19 に示した。上記の培養細胞間で mRNA 蓄積量がいずれかの培養時間で有意差のみられたクローン数と GO 項目を Table 3-4 および Supplementary Table 3-7 に示す。ここでは、OLHdrR-e3 株の 15°C 培養細胞の培養期間に合わせて、3、12 時間、1 および 3 日目の結果を比較した。その結果、解析可能であったクローン数は 952 で、その中、統計解析で 3 日目の mRNA 蓄積量が OLHNI-e1 株および OLHdrR-e3 株間で有意に異なっていたもの ($P < 0.05$) は 127 クローンであった (Supplementary Table 3-7)。これら有意差のみられたクローンでは、OLHNI-e1 株に比べて OLHdrR-e3 株で 3 時間目から減少しているものが多くみられ、3 日目ではとくに顕著であった。3 日目において OLHdrR-e3 株で mRNA 蓄積量が増大し、OLHNI-e1 株で減少傾向にあるものもみられたが、OLHNI-e1 株での減少は全て 2 倍以内に抑えられていた (Fig. 3-19)。

これら温度移行 3 日目の mRNA 蓄積量について両株間で有意差のみられたクローンは Table 3-4 および Supplementary Table 3-7 に示すように様々な GO 項目に属したが、 χ^2 検定により期待値と比べてクローン数が有意に多いと判定された GO 項目は、molecular function の binding に属する nucleotide binding で、また、同 binding に属する metal ion binding のクローン数は OLHdrR-e3 株で 3 日目の mRNA 蓄積量が \log_2 ratio < -0.5 と減少するものが多かった。さらに、molecular

function の transporter activity に属する electron transporter activity のクローンが有意に期待値より多くみられた。一方、molecular function の structural molecule activity に属する structural constituent of ribosome では OLHNI-e1 株および OLHdrR-e3 株で差がみられたのは解析可能の 65 クローンの中、1 クローンのみであった。

15°C 培養 OLHNI-e1 株の 3 日目の mRNA 蓄積量が同温度、同培養期間の OLHdrR-e3 株に比べて有意に増大または減少している遺伝子の詳細を、Table 3-5 および 3-6 に示す。また、これらの階層型クラスタリング解析の結果を Fig. 3-20 に示す。OLHNI-e1 株で mRNA 蓄積量が多かったものには、タンパク質合成に関わる ribosomal protein L22 (RPL22)、eukaryotic translation elongation factor 2 (EEF2)、eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 2 beta (EIF3S2) をコードするクローンがみられた。また、シグナル伝達に関わる zinc finger A20 domain containing 2 (ZA20D2) および myosin light polypeptide kinase (MYLK)、転写調節に関わる zinc finger protein 91 (ZNF91) および 207 (ZNF207)、tudor domain containing 3 (TDRD3) および 7 (TDRD7) をコードするクローンは OLHNI-e1 株で OLHdrR-e3 株より mRNA 蓄積量が多かった。これらのクローンでは、OLHNI-e1 株で 3 日間の培養中、mRNA 蓄積量が増大または一定の傾向を示したが、OLHdrR-e3 株では減少していた (Fig 3-20, Table 3-5)。逆に、OLHdrR-e3 株での mRNA 蓄積量が大きい遺伝子として、inhibitor of DNA binding 1 (ID1) および 3 (ID3) などの負の転写調節に関わるものや、タンパク質分解に関与する ubiquitin-conjugating enzyme E2A (UBE2A) および E2D2 (UBE2D2) をコードするクローンがみられた (Fig. 3-20, Table 3-6)。OLHdrR-e3 株は OLHNI-e1 株に比べ 15°C では増殖がみられなかったが、予想と反して細胞増殖調節に関与する peroxiredoxin 1 (PRDX1) や casein kinase 2 alpha 1 (CSNK2A1) の mRNA 蓄積量は OLHNI-e1 株では 3 日目には減少し、OLHdrR-e3 株では変化しなかった (Fig. 3-20, Table 3-6)。

第3節 考 察

北日本集団由来 OLHNI-e1 株では 25°C 培養細胞の中、1 日目の試料につき、また南日本集団由来 OLHdrR-e3 株では 25°C 培養細胞の 12 時間目および 15°C 培養細胞の 7 日目の試料につき、蛍光標識 cDNA プローブを適切に作製できなかった。すなわち、これらを試料プローブにハイブリダイゼーションを行い蛍光像を取り込んだところ、蛍光強度が低く、実験群間で強度差が著しく大きかったため、データの信頼性を考慮し以後の解析に供さなかった。蛍光強度の低さは調製した全 RNA に起因するものと考えられる。なお、25°C 培養細胞は、温度変化させていない対照群であったことから、実験開始 1 日目の試料中の mRNA 蓄積量に大きな変動はないものと仮定して、この実験群を除き loop design を組み直して解析した。なお、OLHNI-e1 株の 15°C および 25°C 培養細胞、OLHdrR-e3 株の 25°C 培養細胞では、3 日目と 7 日目の mRNA 蓄積量が同じ傾向を示すクローンが多く (Fig. 3-5, 3-7, 3-15)、15°C 培養細胞について 3 日目までの結果で両株の比較を行うことが可能と考えられた。

メダカ 33°C 培養細胞でみられた遺伝子発現の大きな増大や減少については、実験操作の影響によることも考えられる (Fig. 3-9, 3-10)。実験に用いた全 RNA を変性アガロースゲルで電気泳動後、エチジウムブロマイド染色して比較した結果、いずれの試料についても大きな差はみられなかった (図示せず)。Skrypina et al. (2003) はマイクロアレイに用いる全 RNA は、28S/18S rRNA が 2.0 以上であることを推奨している。実験で用いた全 RNA の 28S/18S rRNA は泳動像から判断して十分 2.0 以上あると思われた。一方、Dumur et al. (2004) は 28S/18S rRNA の比にかかわらず、全 RNA 中の rRNA の割合が 30% 以上であれば逆転写後の cDNA サイズの中央値が 2.0 kb と、分析に十分な RNA であると述べている。これは逆に、28S/18S rRNA が十分高くても全 RNA に対する rRNA の割合が 30% 以下であれば問題となることを示唆している。Dumor et al. (2004) は全 RNA の性状を Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, CA, USA) により詳細に調べている。今後の実験では RNA の性状をさらに詳細に検討する必要があると思われる。

ところで、25°Cで培養した北日本集団由来 OLHNI-e1 株の遺伝子発現パターンを調べたところ、Supplementary Table 3-1 に示すように解析可能であった 1,353 クローンの中、19%の 263 クローンの mRNA 蓄積量でいずれかの培養時間の間で有意に異なっていた。これらのクローンはとくに 3 日目と 7 日目で似た増減傾向を示し、温度変化がなくても mRNA 蓄積量を増減させていることを示唆した (Fig. 3-15, 3-16)。

本研究では遺伝子の GO 項目に注目した。25°Cで継代培養した北日本集団由来 OLHNI-e1 株を 15°Cへ移行したとき、いずれかの培養時間の間で有意な変化がみられたクローンについて GO 項目による分類を行った。その結果、Table 3-1 および Supplementary Table 3-2 に示すように多くの GO 項目で、観測されたクローン数と期待されるクローン数が有意に異なっていた。一方、同細胞株を 33°Cへ移行またはそのまま 25°Cで培養したときには観測値が期待値と有意に異なる GO 項目はほとんどなかった。これは、15°Cへ温度移行したときに、特定の機能に関わる遺伝子群が特異的に発現量を変化させていることを示す。

北日本集団由来 OLHNI-e1 株について、25°Cおよび 15°C培養細胞を比較したところ、7 日目において、Fig. 3-12 や Table 3-2 および 3-3 に示すように 159 クローンが両温度間で有意に異なっていた。この中、転写および酵素の活性化に関わる多くのクローンが変化しており、とくに代謝に関わるクローンが 15°Cで有意に減少していた (Table 3-1, Supplementary Table 3-4)。したがって、これらのクローンが関係する機能の調節が 15°Cへの適応に重要であることがわかる。

南日本集団由来 OLHDrR-e3 株を、25°Cから 15°Cへ温度移行したときに、いずれかの培養時間の間で有意に mRNA 蓄積量の変化がみられたクローンを GO 項目により分類した。その結果、OLHNI-e1 株とは異なり χ^2 検定により有意に異なると判定された GO 項目の数は著しく少なかった (Table 3-4, Supplementary Table 3-6)。したがって、OLHDrR-e3 株では特定の遺伝子群のみが特異的に変化していることはなく、15°Cへの適応が行われていない可能性が考えられた。本株では 15°C培養で、細胞内のタンパク質分解に関連する ubiquitin-proteasome system (UPS) の成分の mRNA 蓄積量が上昇していた。したがって、15°Cでは新生タ

ンパク質が本来の立体構造にまで至らず、折りたたみできなかったタンパク質、変性したタンパク質が多く存在していることを示唆している (Pickart, 2004)。

OLHNI-e1 株の 25 および 15°C 培養細胞間で mRNA 蓄積量が有意に異なっていたクローンのうち、GO 項目の molecular function の structural molecule activity に属する structural constituent of ribosome に含まれているものが期待値と比べて有意に少なかった (Table 3-1)。加えて、北日本および南日本集団由来の 2 細胞株間で変化のみられたクローンについても、同 GO 項目に含まれる数が期待値よりも有意に少なかった (Table 3-4)。したがって、これらの温度および集団間で、リボソームを介したタンパク質合成機構に大きな変化はないものと思われる。一方、リボソームの構成成分をコードする RPL22 は、15°C 培養 OLHNI-e1 および OLHdrR-e3 株間でその mRNA 蓄積量が大きく変化していた (Table 3-5)。ここで、ショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* では、広い基質特異性を有し、細胞増殖、成長および代謝などに関わる casein kinase II (CKII) と RPL22 が相互作用することが two-hybrid screening により明らかにされている (Zhao et al., 2002)。リボソームの構成成分としての本分子の働きとは別の機能が OLHNI-e1 株の温度適応能に関わっている可能性も考えられる。

北日本集団由来 OLHNI-e1 および南日本集団由来 OLHdrR-e3 両株において、25°C から 15°C へ温度移行後に細胞数を計測し、細胞形態の観察を行った。その結果、第 1 章の 33°C から 15°C へ温度移行後の場合と同様に、OLHNI-e1 株では 11 日目で実験開始時の 2 倍の細胞数を示した。一方、OLHdrR-e3 株では顕著な細胞増殖はみられず、プレート底面に局所的に分布することが示された (Fig. 3-3B)。Zayas and Schwarz (1992) は、トリ腱由来初代培養株につき、プレート底面上の細胞密度と細胞増殖の関係について調べ、その変化が細胞間のシグナル伝達に関係することを示唆している。興味深いことに、メダカ両細胞株を 25°C から 15°C へ移行したところ、OLHNI-e1 では細胞外に局在するタンパク質をコードするクローンの多くの mRNA 蓄積量は 7 日目に増大傾向にあったが (Table 3-1, Supplementary Table 3-2)、逆に OLHdrR-e3 株では 3 日目で減少していた (Table 3-4, Supplementary Table 3-6)。また、3 日目で mRNA 蓄積量が両株間で有意に異なり、

OLHdrR-e3 株で減少していた 4 つの細胞外局在タンパク質をコードする遺伝子の発現プロファイルを Fig. 3-21 に示した。これらは免疫に関わる complement component 3 (C3)、細胞増殖に関わる decorin (DCN) および gelsolin (GSN) およびシグナル伝達に関わる follistatin-like 1 (FSTL1) であり、これらの mRNA 蓄積量は OLHNI-e1 株では一定の傾向がみられたが、OLHdrR-e3 株では GSN は温度移行 3 時間目から減少しており、そのほかのクローンの mRNA 蓄積量も 3 日目で顕著に減少していた。興味深いことに、DCN は細胞の会合に関与し (Reed and Iozzo, 2003)、また GSN は過剰発現により細胞樹状突起が発達することが知られ (Furnish et al. 2001)、さらに、FSTL1 は transforming growth factor (TGF) β を介した細胞間のシグナル伝達に関わる (Thompson et al., 2005)。したがって、15°C での細胞間の情報伝達は OLHNI-e1 株では正常に働くが、OLHdrR-e3 株ではその作用が弱く、細胞増殖が抑制されていることが示唆される。また、OLHNI-e1 株では転写活性に関与するタンパク質をコードする複数のクローンの mRNA 蓄積量が増大していることから、上記の細胞間シグナル伝達に関わる遺伝子の発現量はこれらの転写因子により調節されている可能性が考えられた。

第4章 総合的考察

水生生物の環境水温の変動に対する生体内反応は、温度変化直後から数日間で起こる適応、数週間を要する温度馴化、および遺伝的形質の獲得による適応の3つに分けることができる (Hazel and Prosser, 1974)。多くの魚種は生息可能な環境水温からはずれると、摂餌能や運動能の低下、生体内成分の機能低下などが生じ、生存することが困難となる。また、この生息可能温度域は細胞レベルで決定されていることが示されている (Mosser et al., 1986; Bols et al., 1992; Arai et al., 1994)。日本に生息するメダカは北日本および南日本集団ともに水温が0°C付近になるような場合でも生存することが可能である。本研究では、温度管理が容易で、細胞数の変化を指標に温度適応能をみることができる培養細胞を用いた (Arai et al., 1994)。

本研究で cDNA マイクロアレイの作製に供したクローンは、厳密には無作為に選出したものではない。メダカの全ゲノムに存在する遺伝子数を、他生物種のものと同様、約 20,000-25,000 遺伝子と仮定すると (International Human Genome Sequencing Consortium, 2004)、今回調べた遺伝子数は全体のおよそ 15%となる。これらの遺伝子は EST 解析により得られたもので、発現量が比較的多い遺伝子群と予想される。ここで、温度依存的な遺伝子発現を直接制御するものは転写因子であると考えられる。Table 3-2、3-3、3-5 および 3-6 に示すように、*ID1*、*ID3*、*ZNF91*、*ZNF207*、*TDRD3* および *TDRD 7* などの転写因子をコードする遺伝子が培養温度の変化によって mRNA 蓄積量を変化させていた。興味深いことに、北日本集団由来 OLHNI-e1 株の 15°C 培養で mRNA 蓄積量が増大していた転写因子の1つ HMGB1 は、脊椎動物間で相同性の高いタンパク質である (Wolffe, 1999; Thomas and Travers, 2001)。このタンパク質はクロマチン中、配列非特異的ではあるが構造特異的に DNA に結合し、他の転写因子と共役して転写を活性化する (Hamada and Bustin, 1985; Stros, 2001; Thomas and Travers, 2001)。また、本遺伝子はアフリカの小型魚類 *Austrofundulus limnaeus* でも温度依存的な発現変動を示すことが報告されている (Pobrabsky and Somero, 2004)。

また、本研究では *IκBα* や *RELB* など NFκB シグナル伝達経路に関わる複数の遺伝子が温度適応関連遺伝子としてスクリーニングされた。NFκB カスケードは細胞の増殖や接着のほか、免疫系との関連が深い (Ghosh et al., 1998)。 *FSTL1* が関わる TGFβ も免疫系で重要な働きを行う (Letterio and Roverts, 1998)。温度適応には免疫系に関わる成分が深く関与することが考えられる (Kikuchi et al., 1995; Anderson and Srivastava, 1999; Magnadóttir et al., 1999; Hirayama et al., 2004)。なお、cytokine-like 1 遺伝子 (*CYTL1*)、*ZA20D2* および *MYLK* などの各種シグナル伝達経路に関わる遺伝子も北日本集団 OLHNI-e1 株 15°C 培養細胞で有意に mRNA 蓄積量を増大していることから (Table 3-2, 3-5)、個体レベルで示唆されるように (Gracey et al., 2004)、細胞レベルの温度適応でもこれらのシグナル伝達経路を介して大規模な生体内の再編が行われることが示された。

Table 3-2 および 3-3 に示したように、温度依存的な発現を示した遺伝子には MEBase 上でアノテートされていないクローンが多くみられた。第 2 章ではアノテートされていない配列をメダカゲノムデータベース検索に供したところ、約 7 割のクローンで相同遺伝子を実験アノテートすることができた。今後、2006 年 1 月に更新されるメダカゲノムデータベースを利用することにより、より効率的にアノテートすることが可能であると思われる。さらに、温度依存的な発現変動を示した遺伝子につき、ゲノムデータベースより発現調節領域を抽出して比較することにより、特異的な転写因子結合配列などを検出することができると期待される。

魚類においては、その進化過程で硬骨魚類に分岐後、大規模な遺伝子重複 (ゲノム倍化) が起きたと考えられている (Taylor et al., 2001)。ゲノムレベルでの重複は、Hox クラスターの例が典型的である。Hox は体軸形成に重要な遺伝子でクラスター状に存在し、またその領域がよく保存されている (Prince, 2002)、哺乳類の Hox 遺伝子クラスターが 4 個であるのに対して魚類では 8 個存在する (Amores et al., 2004)。また、魚類が哺乳類よりも多くのパラログス遺伝子を含む事実も、魚類におけるゲノム倍化の根拠となっている (黒澤・堀, 2000; Taylor et al., 2001; 池田・渡部, 2004)。ここで、cDNA マイクロアレイはその性質上、

配列の類似性が高いアイソフォーム遺伝子を検出する恐れがある。コイにおいては馴化温度に依存して 10°C 型、中間型および 30°C 型の 3 種類の成体速筋型ミオシン重鎖アイソフォームの発現量を変化させており、これらの塩基同一率は著しく高い (Hwang et al., 1990, 1991; Watabe et al., 1998; Guo et al., 1994; Chaen et al., 1996; Hirayama and Watabe, 1997)。メダカにおいてもミオシン重鎖アイソフォーム遺伝子の発現量が温度依存的に変化していることが示されている (梁春実, 2005)。さらに、同一遺伝子の選択的スプライシングによって生ずる遺伝子群についても考慮する必要がある。

第 1 章第 2 節の RT-PCR により得られた温度適応関連遺伝子のうち、*LDHB*、*PABPC1*、*TIM10*、*Rab-1c* および *IκBα* が第 3 章 cDNA マイクロアレイ実験で解析可能のクローンとして得られた。このうち、*IκBα* は OLHNI-e1 株において 25°C から 15°C へ温度移行した際に mRNA 蓄積量が有意に増大していた (Fig. 3-13)。一方、そのほかの遺伝子は 15°C で mRNA 蓄積量が増大する傾向を示すものもあったが、有意差はみられなかった (図示せず)。これら実験結果の違いは、RT-PCR 実験および cDNA マイクロアレイ実験で用いた試料の培養温度設定の相違に由来すると考えられる。さらに、Larkin et al. (2005) は、発現解析手法によって異なるプローブまたはプライマーの配列が解析結果に影響することを報告している。すなわち、前述のように cDNA マイクロアレイ実験ではアイソフォーム遺伝子のプローブへの非特異的結合の影響が考えられる。これらの問題を克服するためには、スプライシングされるエクソンに特異的な配列をもつオリゴヌクレオチドをプローブとしたマイクロアレイを用いるか、または個々の遺伝子に特異的なプライマーを用いた定量的リアルタイム PCR などによる確認を行う必要がある。

そのほか、マイクロアレイ実験で得られた遺伝子発現量の変化につき、生物学的な影響を確認する方法として、外来遺伝子の導入による *in vivo* の実験が考えられる。本研究での細胞を用いた実験では *loop design* を採用するなど有意性の検定には十分に考慮したが、個体レベルの検討は行っていない。

北日本および南日本集団由来のそれぞれ OLHNI-e1 および OLHDrR-e3 株の

15℃培養での細胞増殖能、プレート底面の細胞局在、および細胞外局在タンパク質遺伝子の発現量の相違から、同温度での北日本および南日本集団由来培養細胞株間の温度適応能の相違がこれらの細胞外成分を介した細胞間シグナル伝達に由来すると考えられた。今回得られた遺伝子発現の相違が地域集団別に固定されているのか、あるいは系統や細胞株のみに限定されるのかを明らかにすることが今後の課題である。

以上、本研究では、北日本、南日本および東韓集団近交系メダカ、および近縁種のセレベスメダカ由来の培養細胞につき、温度依存的な増殖能を調べることにより、温度適応能がメダカ地域集団間で異なることを細胞レベルで示した。この成果をもとに、北日本および南日本集団由来の各1株の遺伝子発現プロファイルをcDNAマイクロアレイにより比較した。すなわち、温度移行した細胞を移行前の温度で培養した細胞と遺伝子発現を比較することにより、温度依存的な発現変動を示す遺伝子を検出することができた。さらには、転写因子をはじめ、様々な機能に関わる遺伝子が両株間で有意に発現量の差を示すことを明らかにした。とくに、細胞外局在タンパク質が15℃培養 OLHNI-e1 株における増殖能に深く関与していることが示唆された。このように、cDNA マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現解析が温度適応関連遺伝子のスクリーニングに非常に強力なツールとなることが明らかとなった。本研究によって得られた結果は、狭い温度域でのみ生息可能な有用魚種につき、幅広い温度域への成長および適応する能力を付加できる可能性があり、水産増養殖業へ貢献することも期待される。

参考文献

- Adam SA, Nakagawa T, Swanson MS, Woodruff TK, Dreyfuss G (1986) mRNA polyadenylate-binding protein: gene isolation and sequencing and identification of a ribonucleoprotein consensus sequence. *Mol Cell Biol* 6: 2932-2943
- Allan BB, Moyer BD, Balch WE (2000) Rab1 recruitment of p115 into a cis-SNARE complex: programming budding COPII vesicles for fusion. *Science* 289: 444-448
- Amores A, Suzuki T, Yan YL, Pomeroy J, Singer A, Amemiya C, Postlethwait JH (2004) Developmental roles of pufferfish Hox clusters and genome evolution in ray-fin fish. *Genome Res* 14: 1-10
- Anderson KM, Srivastava PK (1999) Heat, heat shock, heat shock proteins and death: a central link in innate and adaptive immune responses. *Immunol Lett* 74: 35-39
- Arai A, Mitani H, Naruse K, Shima A (1994) Relationship between the induction of proteins in the HSP70 family and thermosensitivity in two species of *Oryzias* (Pisces). *Comp Biochem Physiol* 109B: 647-654
- Baeuerle PA, Henkel T (1994) Function and activation of NF- κ B in the immune system. *Annu Rev Immunol* 12: 141-179
- Bols NC, Mosser DD, Steels GB (1992) Temperature studies and recent advances with fish cells *in vitro*. *Comp Biochem Physiol* 103A: 1-14
- Caissie D, El-Jabi N, Satish MG (2001) Modelling of maximum daily water temperatures in a small stream using air temperatures. *J Hydrol* 251: 14-28
- Chaen S, Nakaya M, Guo XF, Watabe S (1996) Lower activation energy for sliding of F-actin on a less thermostable isoform of carp myosin. *J Biochem* 120: 788-791
- Chen F, Castranova V, Shi X (2001) New insights into the role of nuclear factor- κ B in cell growth regulation. *Am J Pathol* 159: 387-397
- Cossins AR, Prosser CL (1978) Evolutionary adaptation of membranes to temperature. *Proc Natl Acad Sci USA* 75: 2040-2043
- DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278: 680-686
- Driever W, Solnica-Krezel L, Schier AF, Neuhauss SC, Malicki J, Stemple DL, Stainier DY, Zwartkruis F, Adbelilah S, Rangini Z, Belak J, Boggs C (1996) A genetic screen

- for mutations affecting embryogenesis in zebrafish. *Development* 123: 37-46
- Dumur CI, Nasim A, Best AM, Archer KJ, Ladd AA, Mas VR, Wilkinson DS, Garrett CT, Ferreira-Gonzalez A (2004) Evaluation of quality-control criteria for microarray gene expression analysis. *Clin Chem* 50: 1994-2002
- Furnish EJ, Zhou W, Cunningham CC, Kas JA, Schmidt CE (2001) Gelsolin overexpression enhances neurite outgrowth in PC12 cells. *FEBS Lett* 508: 282-286
- Gadaleta G, Pepe G, De Candia G, Quagliariello C, Sbisà E, Saccone C (1988) Nucleotide sequence of rat mitochondrial NADH dehydrogenase subunit 1. GTG, a new initiator codon in vertebrate mitochondrial genome. *Nucleic Acids Res* 16: 6233
- Ghosh S, May MJ, Kopp EB (1998) NF- κ B and Rel proteins: evolutionarily conserved mediators of immune responses. *Annu Rev Immunol* 16: 225-260
- Gracey AY, Fraser EJ, Li W, Fang Y, Taylor RR, Rogers J, Brass A, Cossins AR (2004) Coping with cold: an integrative, multitissue analysis of the transcriptome of a poikilothermic vertebrate. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 16970-16975
- Guo XF, Nakaya M, Watabe S (1994) Myosin subfragment-1 isoforms having different heavy chain structures from fast skeletal muscle of thermally acclimated carp. *J Biochem* 116: 728-735
- Hamada and Bustin M (1985) Hierarchy of binding sites for chromosomal proteins HMG1 and 2 in supercoiled deoxyribonucleic acid. *Biochemistry* 24: 1428-1433
- Han HS, Karabiyikoglu N, Kelly S, Sobel RA, Yenari MA (2003) Mild hypothermia inhibits nuclear factor- κ B translocation in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 23: 589-598
- Harding MM, Anderberg PI, Haymet ADJ (2003) 'Antifreeze' glycoproteins from polar fish. *Eur J Biochem* 270: 1381-1392
- Hashimoto T, Tamaki K, Suzuki K, Yamada Y (1998) Molecular cloning of plant spermidine synthases. *Plant Cell Physiol* 39:73-79
- Hazel JR, Prosser CL (1974) Molecular mechanisms of temperature compensation in poikilotherms. *Physiol Rev* 54: 620-677
- Hazel JR (1995) Thermal adaptation in biological membranes: is homeoviscous adaptation the explanation? *Annu Rev Physiol* 57: 19-42
- Hirayama M, Kobiyama A, Kinoshita S, Watabe S (2004) The occurrence of two types

- of hemopexin-like protein in medaka and differences in their affinity to heme. *J Exp Biol* 207: 1387-1398
- Hirayama Y, Watabe S (1997) Structural differences in the cross bridge head of temperature-associated myosin subfragment-1 isoforms from carp skeletal muscle. *Eur J Biochem* 246: 380-387
- Hirayoshi K, Kudo H, Takechi H, Nakai A, Iwamatsu A, Yamada K, Nagata K (1991) Hsp47: a tissue-specific, transformation-sensitive, collagen-binding heat shock protein of chicken embryo fibroblasts. *Mol Cell Biol* 11: 4036-4044
- Hirawake H, Taniwaki M, Tamura A, Amino H, Tomitsuka E, Kita K (1999) Characterization of the human SDHD gene encoding the small subunit of cytochrome *b* (cybS) in mitochondrial succinate-ubiquinone oxidoreductase. *Biochim Biophys Acta* 1412: 295-300
- Hwang GC, Watabe S, Hashimoto K (1990) Changes of carp myosin ATPase induced by temperature acclimation. *J Comp Physiol* 160B: 233-239
- Hwang GC, Ochiai Y, Watabe S, Hashimoto K (1991) Changes of carp myosin subfragment -1 induced by temperature acclimation. *J Comp Physiol* 161B: 131-146
- Hyodo-Taguchi Y, Egami N. (1985) Establishment of inbred strains of the medaka *Oryzias latipes* and the usefulness of the strains for biomedical research. *Zool Sci* 2: 305-316
- 池田大介, 渡部終五 (2004) トラフグのゲノム解析——もっとも小さなゲノムをもつ脊椎動物. *蛋白質 核酸 酵素* 49: 2235-2241
- International Human Genome Sequencing Consortium (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome *Nature* 431: 931-945
- Itoi S, Kinoshita S, Kikuchi S, Watabe S (2003) Changes of carp F_0F_1 -ATPase in association with temperature acclimation. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 284: 153-163
- 岩松鷹司, 半谷徹 (1989) メダカの種間に見る温度及び海水に対する耐性の差異. *愛知教育大学研究報告* 38: 101-107
- Iwamatsu T (1997) *The Integrated Book for the Biology of the Medaka*. Daigaku Kyoiku Shuppan, Okayama
- Jaffe EK (2000) The porphobilinogen synthase family of metalloenzymes. *Acta*

- Crystallogr D Biol Crystallogr 56: 115-128
- Ju Z, Dunham RA, Liu Z (2002) Differential gene expression in the brain of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in response to cold acclimation. *Mol Genet Genomics* 268: 87-95
- Kakinuma M, Nakaya M, Hatanaka A, Hirayama Y, Watabe S (1998) Thermal unfolding of three acclimation temperature-associated isoforms of carp light meromyosin expressed by recombinant DNAs. *Biochemistry* 37: 6606-6613
- Kakinuma M, Hatanaka A, Fukushima H, Nakaya M, Maeda K, Doi Y, Watabe S (2000) Differential scanning calorimetry of light meromyosin fragments having various lengths of carp fast skeletal muscle isoforms. *J Biochem* 128: 11-20
- Kerr MK, Churchill GA (2001) Experimental design for gene expression microarrays. *Biostatistics* 2: 183-201
- Kerr MK (2003) Design considerations for efficient and effective microarray studies. *Biometrics* 59: 822-828
- Kikuchi K, Yamashita M, Watabe S, Aida K (1995) The warm temperature acclimation-related 65-kDa protein, Wap65, in goldfish and its gene expression. *J Biol Chem* 270: 17087-17092
- Kikuchi K, Itoi S, Watabe S (1999) Increased levels of mitochondrial ATP synthase -subunit in fast skeletal muscle of carp acclimated to cold temperature. *Fisheries Sci* 65: 629-636
- Kimura T, Jindo T, Narita T, Naruse K, Kobayashi D, Shin-I T, Kitagawa T, Sakaguchi T, Mitani H, Shima A, Kohara Y, Takeda H (2004) Large-scale isolation of ESTs from medaka embryos and its application to medaka developmental genetics. *Mech Dev* 121: 915-932
- Koga A (2002) Transposable elements in medaka fish. *Zool Sci* 19: 1-6
- Kohane LS, Kho AT, Butte AJ (2004) 統合ゲノミクスのためのマイクロアレイデータアナリシス (星田有人 翻訳) シュプリンガーフェアラーク東京, 東京
- Komura J, Mitani H, Shima, A (1988) Fish cell-culture-establishment of 2 fibroblast-like cell-lines (OL-17 and OL-32) from fins of the medaka, *Oryzias latipes*. *In Vitro Cell Dev Biol* 24: 294-298
- Kondo H, Watabe S (2004) Temperature-dependent enhancement of cell proliferation

- and mRNA expression for type I collagen and HSP70 in primary cultured goldfish cells. *Comp Biochem Physiol* 138A: 221-228
- 黒澤仁, 堀寛 (2000) 魚類のゲノムと Hox 遺伝子群の進化. *蛋白質 核酸 酵素* 45: 2893-2899
- Langan SJ, Johnston L, Donaghy MJ, Youngson AF, Hay DW, Soulsby C (2001) Variation in river water temperatures in an upland stream over a 30-year period. *Sci Total Environ* 265: 195-207
- Lannan CN, Winton JR, Fryer JL (1984) Fish cell lines: establishment and characterization of nine cell lines from salmonids. *In Vitro* 20: 671-676
- Larkin JE, Frank BC, Gavras H, Sultana R, Quackenbush J (2005) Independence and reproducibility across microarray platforms. *Nat Methods* 2: 337-44
- Letterio JJ, Roverts AB (1998) Regulation of immune responses by TGF-beta. *Annu Rev Immunol* 16: 137-161
- Magnadóttir B, Jónsdóttir H, Helgason S, Björnsson B, Jørgensen TØ, Pilström L (1999) Humoral immune parameters in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) II. The effects of size and gender under different environmental conditions. *Comp Biochem Physiol* 122B: 181-188
- Malek RL, Sajadi H, Abraham J, Grundy MA, Gerhard GS (2004) The effects of temperature reduction on gene expression and oxidative stress in skeletal muscle from adult zebrafish. *Comp Biochem Physiol* 138C: 363-373
- Marra M, Hillier L, Kucaba T, Allen M, Barstead R, Beck C, Blistain A, Bonaldo M, Bowers Y, Bowles L, Cardenas M, Chamberlain A, Chappell J, Clifton S, Favello A, Geisel S, Gibbons M, Harvey N, Hill F, Jackson Y, Kohn S, Lennon G, Mardis E, Martin J, Mila L, McCann R, Morales R, Pape D, Person B, Prange C, Ritter E, Soares M, Schurk R, Shin T, Steptoe M, Swaller T, Theising B, Underwood K, Wylie T, Yount T, Wilson R, Waterston R (1999) An encyclopedia of mouse genes. *Nat Genet* 21: 191-194
- May MJ, Ghosh S (1998) Signal transduction through NF-κB. *Immunol Today* 19: 80-88
- Miller RT, Christoffels AG, Gopalakrishnan C, Burke J, Ptitsyn AA, Broveak TR, Hide WA (1999) A comprehensive approach to clustering of expressed human gene

- sequence: the sequence tag alignment and consensus knowledge base. *Genome Res* 9: 1143-1155
- Mitani H, Naruse K, Shima A (1989) Eurythermic and stenothermic growth of cultured fish cells and their thermosensitivity. *J Cell Sci* 93: 731-737
- Mitani H, Shima A, Naruse K, Tanaka M (2004) Medaka genome mapping for functional genomics. In: Gong Z, Korzh V (ed) *Fish Development and Genetics*. World Scientific, Toh Tuck Link, Singapore, pp 612-636
- Mosser DD, Heikkila JJ, Bols NC (1986) Temperature ranges over which rainbow trout fibroblasts survive and synthesize heat-shock proteins. *J Cell Physiol* 128: 432-440
- Nakaya M, Kakinuma M, Watabe S (1997) Differential scanning calorimetry and CD spectrometry of acclimation temperature-associated types of carp light meromyosin. *Biochemistry* 36: 9179-9184
- 中山広樹 (2000) 定量的 PCR, PCR を用いた定量的実際. *バイオ実験イラストレイテッド*③新版 本当にふえる PCR (田中弥生 編) pp.141-186, 秀潤社, 東京
- Naruse K, Fukamachi S, Mitani H, Kondo M, Matsuoka T, Kondo S, Hanamura N, Morita Y, Hasegawa K, Nishigaki R, Shimada A, Wada H, Kusakabe T, Suzuki N, Kinoshita M, Kanamori A, Terado T, Kimura H, Nonaka M, Shima A (2000) A detailed linkage map of medaka, *Oryzias latipes*: comparative genomics and genome evolution. *Genetics* 154: 1773-1784
- Oleksiak MF, Churchill GA, Crawford DL (2002) Variation in gene expression within and among natural populations. *Nat Genet* 32: 261-266
- Oleksiak MF, Roach JL, Crawford DL (2005) Natural variation in cardiac metabolism and gene expression in *Fundulus heteroclitus*. *Nat Genet* 37: 67-72
- Perou CM, Jeffrey SS, Van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, Pergamenschikov A, Williams CF, Zhu SX, Lee JCF, Lashkari D, Shalon D, Brown PO, Botstein D (1999) Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 9212-9217
- Pickart CM (2004) Back to the future with ubiquitin. *Cell* 116: 181-190
- Prince VE (2002) The Hox paradox: more complex(es) than imagined. *Dev Biol* 249: 1-15

- Place AR, Powers DA (1979) Genetic variation and relative catalytic efficiencies: lactate dehydrogenase B allozymes of *Fundulus heteroclitus*. Proc Natl Acad Sci USA 76: 2354-2358
- Pobrabsky J and Somero GN (2004) Changes in gene expression associated with acclimation to constant temperatures and fluctuating daily temperatures in an annual killifish *Austrofundulus limnaeus*. J Exp Biol 207: 2237-2254
- Reed CC, Iozzo RV (2003) The role of decorin in collagen fibrillogenesis and skin homeostasis. Glycoconj J 19: 249-255
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology. Humana Press, Totowa, pp 365-386
- Rothwarf DM, Karin M (1999) The NF- κ B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. Sci STKE 1999: RE1
- 梁春実 (2005) メダカ速筋ミオシン重鎖遺伝子の温度依存的発現調節に関する研究. 東京大学学位論文
- Sachs AB, Bond MW, Kornberg RD (1986) A single gene from yeast for both nuclear and cytoplasmic polyadenylate-binding proteins: domain structure and expression. Cell 45: 827-835
- Sakaizumi M, Moriwaki K, Egami N (1983) Allozymic variation and regional differentiation in wild population of the fish *Oryzias latipes*. Copeia 1983: 311-318
- Sakaizumi M (1986) Genetic divergence in wild populations of the medaka *Oryzias latipes* (Pisces: Oryziatidae) from Japan and China. Genetica 69: 119-125
- Sakaizumi M, Jeon SR (1987) Two divergent groups in the wild populations of medaka *Oryzias latipes* (Pisces: Oryziatidae) in Korea. Kor J Limnol 20: 13-20
- Sasaki K, Tashiro K, Kuhara S, Mihara K (2003) Response of genes associated with mitochondrial function to mild heat stress in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. J Biochem 134: 373-384
- Seachrist JL, Ferguson SSG (2003) Regulation of G protein-coupled receptor endocytosis and trafficking by Rab GTPases. Life Sci 74: 225-235
- Senior AE (1988) ATP synthesis by oxidative phosphorylation. Physiol Rev 68: 177-231
- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO (1995) Quantitative monitoring of gene

- expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 270: 467-470
- Shima A, Nikaido O, Shinohara S, Egami N (1980) Continued *in vitro* growth of fibroblast-like cells (RBCF-1) derived from the caudal fin of the fish, *Carassius auratus*. *Exp Gerontol* 15: 305-314
- Shima A, Shimada A, Komura, J, Isa K, Naruse, K, Sakaizumi M, Egami N (1985) The preservation and utilization of wild populations of the medaka *Oryzias latipes*. *Medaka* 3: 1-4
- Shima A, Mitani H (2004) Medaka as a research organism: past, present and future. *Mech Dev* 121: 599-604
- Sirrenberg C, Endres M, Folsch H, Stuart RA, Neupert W, Brunner M (1998) Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature* 391: 912-915
- Skrypina NA, Timofeeva AV, Khaspekov GL, Savochkina LP, Beabealashvili RS (2003) Total RNA suitable for molecular biology analysis. *J Biotechnol* 105: 1-9
- Slechtova V, Bohlen J, Freyhof J, Persat H, Delmastro GB (2004) The Alps as barrier to dispersal in cold-adapted freshwater fishes? Phylogeographic history and taxonomic status of the bullhead in the Adriatic freshwater drainage. *Mol Phylogenet Evol* 33: 225-239
- Stros M (2001) Two mutations of basic residues within the N-terminus of HMG-1 B domain with different effects on DNA supercoiling and binding to bent DNA. *Biochemistry* 40: 4769-4779
- Sun Y, Wilson MP, Majerus PW (2002) Inositol 1,3,4-trisphosphate associates with the COP9 signalosome by binding to CSN1. *J Biol Chem* 277: 45759-45764
- Takehana Y, Nagai N, Matsuda M, Tsuchiya K, Sakaizumi M (2003) Geographic variation and diversity of the cytochrome *b* gene in Japanese wild populations of medaka, *Oryzias latipes*. *Zool Sci* 20: 1279-1291
- Taylor JS, De Peer YV, Braasch I, Meyer A (2001) Comparative genomics provides evidence for an ancient genome duplication event in fish. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 356: 1661-1679
- The Gene Ontology Consortium (2000) Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nat Genet* 25: 25-29
- Thomas JO, Travers AA (2001) HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding

- proteins. *Trends Biochem Sci* 26: 167-174
- Thompson TB, Lerch TF, Cook RW, Woodruff TK, Jardetzky TS (2005) The structure of the follistatin: activin complex reveals antagonism of both type I and type II receptor binding. *Dev Cell* 9: 535-543
- 若松佑子, 尾里建二郎 (1998) メダカの地域集団・近交系・突然変異系統. *蛋白質核酸酵素* 43: 1487-1491
- Wakamatsu Y, Pristiyazhnyuk S, Kinoshita M, Tanaka M, Ozato K (2001) The see-through medaka: a fish model that is transparent throughout life. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10046-10050
- Watabe S, Hirayama Y, Nakaya M, Kakinuma M, Kikuchi K, Guo XF, Kanoh S, Chen S, Ooi T (1998) Carp express fast skeletal myosin isoforms with altered motor functions and structural stabilities compensate for changes in environmental temperature. *J Therm Biol* 22: 375-390
- Wickens, TD (1989) *Multiway Contingency Tables Analysis for the Social Sciences*. Lawrence Erlbaum Associations, New Jersey
- Wirtenberger M, Hemminki K, Chen B, Burwinkel B (2005) SNP microarray analysis for genome-wide detection of crossover regions. *Hum Genet* 117: 389-397
- Wittbrodt J, Shima A, Schartl M (2002) Medaka – a model organism from the far east. *Nat Rev Genet* 3: 53-64
- Wolffe AP (1999) Architectural regulations and HMG1. *Nat Genet* 22: 215-217
- Yamashita M, Ojima N, Sakamoto T (1996) Molecular cloning and cold-inducible gene expression of ferritin H subunit isoforms in rainbow trout cells. *J Biol Chem* 271: 26908-26913
- Zayas JR, Schwarz RI (1992) Evidence supporting the role of a proteinaceous, loosely bound extracellular molecule in the cell density signaling between tendon cells. *In Vitro Cell Dev Biol* 28A: 745-54
- Zerial M, McBride H (2001) Rab proteins as membrane organizers. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 107-119
- Zhao W, Bidwai AP, Glover CVC (2002) Interaction of casein kinase II with ribosomal protein L22 of *Drosophila melanogaster*. *Biochem Biophys Res Commun* 298: 60-66
- Zheng H, Dai J, Stoilova D, Li Z (2001) Cell surface targeting of heat shock protein

gp96 induces dendritic cell maturation and antitumor immunity. *J Immunol* 167:
6731-6735