

爬虫類を用いた進化医学的アプローチ

—非モデル生物を用いた分子遺伝学の確立—

野地 亮太、野村 真

京都市立医科大学大学院医学研究科 神経発生生物学

要約

マウスは疾患研究のモデルとして大変優れた面を持っているが、マウス自体の種特異的な性質に基づく表現型をどのようにしてヒトの表現型の理解に結びつけるのか、課題も多い。本稿では、人為選択によって生じた家畜や伴侶動物、愛玩動物の遺伝病に焦点を当て、こうした疾患研究の歴史を概説する。さらに、あまり注目されていない爬虫類を用いた研究について紹介することにより、ヒト病態モデルとしての可能性について考察したい。

緒言

当研究室ではモデル生物として用いられている哺乳類のマウスだけでなく、スッポンやヤモリといった爬虫類を用いて研究を行なっている。医学研究の目的はヒト疾患の病態の解明や治療法の確立が目的であるため、ヒトから系統的に遠いこれらの種を医学研究に用いることに違和感を持つ方もいるだろう。マウスを用いたヒトの病態研究は、マウスが哺乳類としての生物学的特徴をヒトと共有していることを前提としている。こうした動物群に共通した形質に加えて、種特異的な特徴を生み出した進化過程を明らかにすることは、ヒトの病態理解にもつながる。近年、モデル動物として確立されていない様々な動物種のゲノムやトランスクリプトーム情報のリソースも整備されており、多様な生物種間で表現型と遺伝子型との関連を解析することが容易になりつつある。特に、家畜化の過程で生じた様々な遺伝子変異は、ヒト疾患の優れたモデル系を提供する。本稿では、家畜や愛玩動物に見られる様々な遺伝病について概説する。さらに、これまで実験動物として確立されてこなかった爬虫類を用いた生命科学研究を紹介し、医学研究の新しいアプローチについて概説したい。

人為選択とそれに伴う疾患

有史以前より、人類は様々な家畜や愛玩動物の品種改良を行なってきた。この家畜化の過程において、食肉としての有用性やヒトに対する従順性など人類にとって都合の良い表現型が選別され人為的に交配され続けた結果、野生集団では決して存在しないような表現型が創出された。こうしたヒトによる表現型の選択は、自然選択の対比として「人為選択」と呼ばれている。品種改良についてはダーウィンも大変興味を持っていた。実際、ハトの人為選択に関するダーウィンの研究は、創造論を代表とするキリスト教的価値観が強かった当時の科学界において自然選択説の受容に大きく貢献したといわれている。

一方、人為的に創出された近交系動物の多くが様々な先天性疾患を合わせ持っていることも知られている。有名な例として、伴侶動物のイヌの例があげられる。特定の犬種、例えばトイプードルではアレルギー皮膚炎、ゴールデンレトリバーにおいては股関節形成不全といったように、犬種特異的な遺伝性疾患が知られている。また、こうした遺伝性疾患はヒト疾患のモデルとして有用であることも指摘されている [1]。人為選択による疾患は、医学研究によく用いられるハツカネズミ (*Mus musculus*) の基準系統の1つである C57BL/6 にも存在する。C57BL/6 は戻し交雑によって近交化されており、遺伝的バックグラウンドが個体間で均一な集団であるため、遺伝学、発生学、生理学の広い分野で用いられてきた。おそらく読者の中にも研究において使用した経験のある方も多いただろう。しかしながら C57BL/6 は決して「均一」な集団ではなく、複数の研究機関で維持される過程で生じたいくつかの亜系統に分かれることが知られている [2]。加えて、C57BL/6 の成体は遅発性難聴を一定の割合で発症することが知られている。実際、C57BL/6 では聴覚器官のコルチ器の機能に重要な役割を果たす遺伝子 *Cdh23* (カドヘリン 23) に変異が見つかった [3]。実はこの *Cdh23* の変異遺伝子は江戸時代で血統化された舞鼠 (まいねずみ) に由来するのではないかと一説には言われている。あまり知られていないが、江戸時代の日本ではペットとしてハツカネズミを飼育する文化があり、なんと「珍翫鼠育艸 (読み:ちんがんそだてぐさ)」という、様々なハツカネズミの系統を記したカタログまで出版されていた。この本の中で、舞鼠は内耳の異常を呈し旋回運動することが記載されている。これは現在の C57BL/6 の *Cdh23* の変異が原因の遅発性難聴の表現型と一致する。さらに近年の分子系統解析により、これが当時の動物商によって欧米に輸出され、今の近交系マ

ウスの祖先になったことが明らかになっている [4]。ちなみに前述した「舞鼠」の表現型を呈するマウスを **walzer mouse** (ワルツを踊るマウス) と呼称することもある。この名称は「舞鼠」が欧米に輸出された後に「**Japanese walzer mouse**」と呼ばれ、当時の実験動物として用いられたことに由縁があると考えられている [5]。C57BL/6 だけではなく、「野生型」として用いられている多くのマウス血統でこうした疾患が頻繁に見られる。したがって研究材料としてマウスを用いる際には、こうした野生型マウスが持つ表現型を考慮する必要がある。

近交化に起因すると予測される疾患はこうした動物だけではなくヒトの歴史の中でも報告されている。その代表例ともいえるのが英国王室における血友病である。血友病は血液凝固因子の遺伝子変異が原因であるが、歴史を振り返ると英国王室と婚姻関係にあった帝政ロシアのロマノフ王朝の家系にこの遺伝子変異の保因者がいたと予測されている。実際、帝政ロシアのアレクセイ皇太子 (**Alexei Nikolaevich Romanov**) もこの血友病に苦しめられたという。アレクセイ皇子を祈祷することによって血友病を治療できると主張し、ラスプーチン (**Grigori Efimovich Rasputin**) がロマノフ王朝に取り入れたことが帝政政治の腐敗化の遠因と言われている [6]。帝政ロシアの政治的腐敗は、日露戦争の勝利による大日本帝国の列強への仲間入り、そしてレーニンによるロシア革命の民衆の支持の遠因となった。見方を変えれば、遺伝子の変異とその選択が人類史に少なからず影響を与えたとも解釈できる。

爬虫類の遺伝性疾患

前項では様々な飼育動物の人為選択に伴う遺伝性疾患について紹介した。その多くは品種改良という人為選択が原因となっており、ヒトの疾患モデルになりうることもお分かりいただけたかと思う。ところで読者は、爬虫類にもイヌやネコのような「品種」が存在することはご存じだろうか。近年のコロナ禍により、従来の伴侶動物以外にも爬虫類の飼育に興味を持つ人が増えており、特にヤモリ、カメレオン、ヘビなど、独特の体色や模様を持つ種は人気が高い。こうした体色のバリエーションは、ブリーダーが行う近交化によって系統化されている。また、こうした個々の系統が示す体色のバリエーションの系統を「モルフ」と一般的には言われている。モルフのバリエーションに最も富む種の1つが、地表性ヤモリの1種であるヒョウモントカゲモドキである。この種の各モルフは特異的な先天性疾患を合わせ持っていることが、ブリーダーの間

でもよく知られている。例えば、アルビノ（白化）系統や日食を意味するエクリプスと呼ばれるヒョウモントカゲモドキのモルフでは、虹彩と眼球強膜のすべてが黒色となる個体が生まれるが、この系統では一定の割合で弱視の個体が発生する。またオスの不妊を併発するスーパーマックスノー系統や、神経障害を発症するエニグマ、転移性腫瘍を併発するレモンフロスト系統など、多数のモルフ系統において重篤な遺伝性疾患が報告されている。中でもレモンフロストに関しては学術的な記述として既に遺伝学的な研究が比較的進んでおり、原因となる遺伝子座が同定されている [7]。さらに、モルフが創出されている爬虫類はヒョウモントカゲモドキだけではない。ヘビが苦手な方は悲鳴を上げてしまうかもしれないが、カルフォルニアキングスネークやカーペットパイソンのモルフも大変人気がある。これらの種の疾患研究はほとんど進んでいないが、近年ゲノムワイド解析によって色素の変化をもたらす **MITF** 遺伝子座が同定された。興味深いことにこの **MITF** は色素細胞の分化に寄与していることが明らかとなっており、またこの遺伝子はヒトではワールデンブルグ病 2 型 (**Waardenburg syndrome type 2**) の発症に関連することも報告されている [8]。

また近年ではヤモリを用いた再生科学研究も行われている。ヤモリを含むトカゲの仲間は、外敵から襲われた際に尾の自切（トカゲの尻尾切り）を行う。尾は時間が経過すると一見元通りになるが、実は軟骨は再生するが中枢神経系や硬骨の分化が起こらないため、自切前の尾が完全に再生するわけではない。一方、胚発生の段階では尻尾を切っても中枢神経系や硬骨の再構築が起こることが知られている。オガサワラヤモリを用いた最近の研究では、トカゲの再生尾における神経の欠損は成体神経幹細胞の分化能の制限に起因することが示唆されている [9]。このような実験は再生能が極めて低いマウスでは非常に困難である。このように爬虫類を用いた研究も、再生医学の基盤整備に有用な知見を提供しうることが分かる。加えてこの研究の中で用いられているオガサワラヤモリはメスだけで単為生殖できることが知られており、ほぼ遺伝的に均一な集団とみなせる。かつ繁殖も容易なため、後述されるソメワケササクレヤモリと同様に新規の医学研究のモデル生物の可能性が期待される。

爬虫類を用いた進化医学的アプローチ

種に特有の生命現象を解明することによってヒトの生物学的特性を理解しようとする場合、マウスだけでなく様々な動物種を用いた実験系を構築する必要がある。そこ

で当研究室では、爬虫類のモデル動物としてソメワケササクレヤモリ (*Paroedura pictus*) を飼育している (図 1)。ソメワケササクレヤモリはマダガスカル産の地上性ヤモリで、飼育と繁殖が極めて容易な小型爬虫類である。欧米の学術研究でしばしば用いられているグリーンアノール (*Anolis carolinensis*) は、日本では特定外来生物に指定されており、日本国内における運搬や飼育が原則禁止されている。一方、ソメワケササクレヤモリは日本国内での飼育・繁殖に規制は無い。さらに、ソメワケササクレヤモリは他の爬虫類と比較して性成熟が早く、交配が簡便で、マウスなどの他のモデル動物と同様に小スペースでの飼育と繁殖が可能である。さらに、近年ソメワケササクレヤモリのゲノム配列とトランスクリプトーム情報が公開されており [10]、ゲノム操作を行うための基盤が整備されている。当研究室ではソメワケササクレヤモリの胚操作と遺伝子改変技術を確認している [11, 12]。これらの技術とゲノム編集技術を組み合わせ、時期・空間的な遺伝子変異の導入や遺伝子変異の校正を行うことによって、さまざまなモルフが持つ致死性表現型をソメワケササクレヤモリで模倣したり、あるいは正常な配列を持つ遺伝子と置換したりすることが原理的には可能である。



図 1 研究室で飼育しているソメワケササクレヤモリの成体

近年、アノールトカゲ (グリーンアノール) の輸卵管内への CRISPR/Cas9 コンストラクションの注入によるゲノム編集個体の作出が報告されている [13]。著者らは、交配後のメスの輸卵管内に存在する受精卵に対して、チロシナーゼ遺伝子を標的とした Cas9 タンパク質とガイド RNA の混合物を注入するという方法を採用している。そ

の後、孵化した個体の体色の検討を行い、アルビノ個体（チロシナーゼ変異個体）の作製に成功している。また、異なる発生ステージの受精卵にコンストラクションを導入することにより、最も効率的にゲノム編集が行われるステージを決定している。こうした技術をソメワケササクレヤモリに応用することも可能である。さらに、発生時期・領域特異的な Cas9 の導入によるチロシナーゼ変異モザイク個体を作出することも不可能ではない。例えば、輸卵管への遺伝子導入により、チロシナーゼ遺伝子のエクソン配列を標的としたガイド RNA をゲノムに組み込んだソメワケササクレヤモリを作成する。胚発生を進行させたのち、Cas9 遺伝子を組み込んだアデノウイルスベクターを表皮細胞に導入し、体表面の特定領域におけるチロシナーゼ遺伝子機能の破壊を行うといった計画が考えられる。さらに、Allelic drive という技術を用いることにより、変異アリルをヘテロ接合で持つ細胞において、変異した遺伝子のみを除去することも原理的には可能である [14]。具体的には、遺伝子の変異箇所およびその周辺のゲノム領域を標的としたガイド RNA が組み込まれた染色体と正常な染色体をヘテロ接合で持つ動物を作製し、この動物の表皮細胞に Cas9 発現アデノウイルスベクターを導入する。すると、Cas9 が発現する表皮細胞では allelic drive により変異チロシナーゼ遺伝子の配列が除去されることが期待される。この技術は、アミノ酸の非同義置換による機能獲得型変異を除去するのに有用であると考えられる。

おわりに

本稿で概説したように、伴侶動物やエキゾチックアニマルの先天性疾患の多くはヒト疾患との類似性が指摘されており、こうした動物を対象とした遺伝学的研究は動物福祉のみならずヒト医学研究にも有用である。さらに近年のゲノム編集技術の確立によって、様々な生物のトランスジェニック系統の樹立も可能となっており、バイオリソースの充実にも大きく貢献する。人為選択は自然選択による進化の歴史を大幅に短縮することによって生物の様々な形質を変化させる過程とも言える。家畜化に伴って生じた遺伝的変化の解析は、ヒト進化の過程で生じた特異的な形質や疾患の原因や病態の理解に新たな視点からのアプローチをもたらすことが期待される。

謝辞

本稿の執筆に助言を頂いた京都府立医科大学神経発生生物学の教室員の方がたに感

謝の意を表する。

利益相反

本稿に関する利益相反事項に関して特記することは無い。

参考文献

1. 桃沢幸秀 (2012). ヨーロッパイヌゲノム共同研究: LUPA プロジェクト. 動物遺伝育種研究 *40*, 37-49.
2. 目加田和之 (2016). C57BL/6 マウスの亜系統差について. *Proceedings of Okayama Association for Laboratory Animal Science* *32*, 22-27.
3. Di Palma, F., Holme, R.H., Bryda, E.C., Belyantseva, I.A., Pellegrino, R., Kachar, B., Steel, K.P., and Noben-Trauth, K. (2001). Mutations in *Cdh23*, encoding a new type of cadherin, cause stereocilia disorganization in waltzer, the mouse model for Usher syndrome type 1D. *Nat Genet* *27*, 103-107.
4. Takada, T., Ebata, T., Noguchi, H., Keane, T.M., Adams, D.J., Narita, T., Shin, I.T., Fujisawa, H., Toyoda, A., Abe, K., et al. (2013). The ancestor of extant Japanese fancy mice contributed to the mosaic genomes of classical inbred strains. *Genome Res* *23*, 1329-1338.
5. Gates, W.H. (1925). The Japanese Waltzing Mouse, Its Origin and Genetics. *Proc Natl Acad Sci U S A* *11*, 651-653.
6. Aronova-Tiuntseva, Y., and Herreid, C. (2003). "Hemophilia " The royal disease. In National Center for Case Study Teaching in Science Case Study Collection. (University at Buffalo, State of New York), pp. 1-5.
7. Guo, L., Bloom, J., Sykes, S., Huang, E., Kashif, Z., Pham, E., Ho, K., Alcaraz, A., Xiao, X.G., Duarte-Vogel, S., et al. (2021). Genetics of white color and iridophoroma in "Lemon Frost" leopard geckos. *PLoS Genet* *17*, e1009580.
8. Ullate-Agote, A., and Tzika, A.C. (2021). Characterization of the Leucistic Texas Rat Snake *Pantherophis obsoletus*. *Front in Ecol Evol* *9*, 583136.
9. Lozito, T.P., Londono, R., Sun, A.X., and Hudnall, M.L. (2021). Introducing dorsoventral patterning in adult regenerating lizard tails with gene-edited

- embryonic neural stem cells. *Nat Commun* *12*, 6010.
10. Hara, Y., Takeuchi, M., Kageyama, Y., Tatsumi, K., Hibi, M., Kiyonari, H., and Kuraku, S. (2018). Madagascar ground gecko genome analysis characterizes asymmetric fates of duplicated genes. *BMC Biol* *16*, 40.
 11. Nomura, T., Kawaguchi, M., Ono, K., and Murakami, Y. (2013). Reptiles: a new model for brain evo-devo research. *J Exp Zool B Mol Dev Evol* *320*, 57-73.
 12. Nomura, T., Ohtaka-Maruyama, C., Kiyonari, H., Gotoh, H., and Ono, K. (2020). Changes in Wnt-Dependent Neuronal Morphology Underlie the Anatomical Diversification of Neocortical Homologs in Amniotes. *Cell Rep* *31*, 107592.
 13. Rasys, A.M., Park, S., Ball, R.E., Alcalá, A.J., Lauderdale, J.D., and Menke, D.B. (2019). CRISPR-Cas9 Gene Editing in Lizards through Microinjection of Unfertilized Oocytes. *Cell Rep* *28*, 2288-2292 e2283.
 14. Guichard, A., Haque, T., Bobik, M., Xu, X.S., Klanseck, C., Kushwah, R.B.S., Berni, M., Kaduskar, B., Gantz, V.M., and Bier, E. (2019). Efficient allelic-drive in *Drosophila*. *Nat Commun* *10*, 1640.