

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月11日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究（S）

研究期間：2007年度～2011年度

課題番号：19101002

研究課題名（和文）メダカ逆遺伝学的手法を基盤とした個体・組織レベルでの損傷応答解析系の確立

研究課題名（英文）Establishment of reverse genetics in medaka

研究代表者

藤堂 剛（TODO TAKESHI）

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90163948

研究成果の概要（和文）：

本申請は、「メダカを用いた個体・組織レベルでの遺伝子機能解析系の確立」を目指している。逆遺伝学的手法を確立し、そこで得られた変異個体をベースに、別途確立する組織特異的遺伝子発現系により組織特異的に当該遺伝子発現の制御を行い、組織間・異なるタイプの細胞間での遺伝子機能の違い、その最終生物作用の違いを解析する、というのが基本戦略である。このグランドデザインのもとにモデルケースとして、「DNA 損傷に対する生物応答、その生物作用」を「突然変異生成」を指標に解析する系を確立した。

研究成果の概要（英文）：

To develop the system to study gene function at tissue level in medaka, we have established two methods in the present study. 1) Reverse genetics: TILLING (Targeting Induced Local Lesions IN Genome) is a reverse genetic strategy that combines random chemical mutagenesis with high-throughput discovery of induced mutations in the target genes. The method has been applied to a variety of plant and animal species. Screening of induced mutation is the most important step in TILLING. We developed the High Resolution Melting (HRM) assay, evaluated its efficacy for screening ENU-induced mutations in the medaka TILLING library. The HRM assay is fast, cost-effective, and robust in detecting variations in DNA. By HRM assay many nonsense mutations were identified and the phenotypes of these nonsense mutants confirmed their loss-of-function nature. 2) Regulation of gene expression in tissue: Infrared laser-evoked gene operator (IR-LEGO) is a microscope system optimized for heating cells at single cell level. Heat stress induces transcription of genes that are under the control of a heat shock promoter in individual targeted cells. We applied this technique to medaka fish carrying a heat shock promoter driven transgene and have succeeded the control of ectopic gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	21,000,000	6,300,000	27,300,000
2008年度	17,400,000	5,220,000	22,620,000
2009年度	16,200,000	4,860,000	21,060,000
2010年度	14,100,000	4,230,000	18,330,000
2011年度	14,100,000	4,230,000	18,330,000
総計	82,800,000	24,840,000	107,640,000

研究分野：分子放射線遺伝学

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響科学

キーワード：メダカ・逆遺伝学・突然変異・DNA 損傷・DNA 修復

1. 研究開始当初の背景

小型魚は、ヒトとほぼ同等の内部臓器を供えた優れたモデル実験動物である。ゲノム解読が完了しており、また、細胞レベルの空間分解能を伴った生体イメージング技術を駆使できるという他の脊椎動物には見られない特質を備えている。また、卵として体外で胚発生が進むことから、胚操作が極めて容易である。小型魚の中でもメダカには色素欠損系統も存在する事から、より内部の変化が観察しやすいため、蛍光色素を用いたライブイメージング技術の応用性も極めて高い。以上の利点から、小型魚は生物学、基礎医学等の基礎研究のみならず、疾患モデル・創薬スクリーニング等の応用研究においてもその有用性が注目されている。我々は、以上の特徴からメダカをモデル動物として選び、本基盤研究(S)において、そのモデル実験動物としての基盤整備・技術開発を行い、それらを基盤にした「組織レベルでの遺伝子機能解析の方法論の確立」というプロジェクトを提案した。

2. 研究の目的

本提案では、以下の2つの技術開発を目的とした。

(1) 逆遺伝学的手法の確立：これまでメダカでは遺伝子ノックアウトが不可能であった。ゲノム情報が基盤となるポストゲノム研究において、実験モデル動物としての決定的な欠点となる。そこで申請者は、TILLING(Targeted Induced Local Lesions IN Genome)と呼ばれる方法(以下に詳細を述べる)によりメダカにおける逆遺伝学的手法の開発を行い、任意の目的遺伝子をノックアウトできる系の確立を目指した。

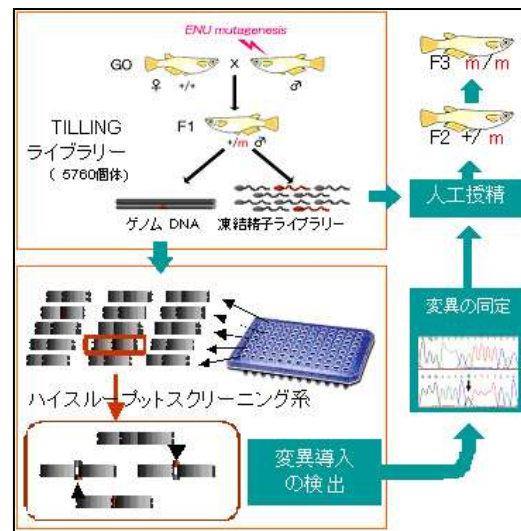
(2) 組織特異的遺伝子発現系の確立：メダカの胚発生は透明な卵の中ですすむため、それらの過程を外から観察する事が可能である。組織特異的遺伝子発現系はこの特徴をフルに利用したもので、赤外レーザーによるヒートショックにより、CRE/LoxP系を組織特異的に動かし遺伝子発現を誘導する。目的の標的細胞・組織で特異的に遺伝子発現をオン・オフする事が可能になる。

細胞レベルでの遺伝子発現制御は、RNAi技術の普及、DT40細胞による遺伝子破壊法の確立等、様々な技術開発により極めて詳細な解析が可能になっている。しかしながら、組織・個体レベルでの解析はこれらの技術では不可能であり、遺伝子変異体の作成が必須となる。メダカに於いて遺伝子変異体の作成を可能にしたのが1)の技法である。

3. 研究の方法

(1) 逆遺伝学的手法の確立：遺伝子の機能

解析において、遺伝子変異体が極めて貴重な情報源である事は、これまでの生物学の歴史からも明白である。更に、ゲノム生物学時代の到来は、遺伝子の取得を容易にし、得られた遺伝子の生体における機能を解析するといった逆遺伝学的手法の必要性を増大させてきた。逆遺伝学には、標的とする遺伝子の変異体を自由に作成する、いわゆる遺伝子ノックアウトの手法が必須である。しかしながら、遺伝子ノックアウトは酵母やマウス等のごく限られたモデル生物でのみ可能であり、メダカを含む小型魚においてもこの手法の確立の必要性が叫ばれてきた。TILLING法とは、化学変異原処理により変異を導入した後、次世代個体を作製し、その次世代個体ゲノムDNA中に誘発変異を検出する事により変異体を得る方法である(下図にそのプロトコールを示す)。ある程度の遺伝学が可能な実験



モデル生物を対象に、目的とする遺伝子の変異体を自由に作成する方法として近年開発され、シロイヌナズナやゼブラフィッシュでその有用性が報告されている。我々は、本研究に先行する基盤研究(A)((平成16-18年度)「突然変異生成機構の分子遺伝学的解析：メダカを用いた分子・個体レベルでの解析系」研究代表者：藤堂)において、変異誘発メダカ6000個体からのゲノムDNA/凍結精子ライブラリーを作成した。本基盤研究(S)により変異検出法も含め、TILLING法によるメダカ逆遺伝学の確立を目指した。

TILLING法において最も重要なのは、作成したゲノムDNAライブラリーから目的遺伝子のナンセンス変異をスクリーニングするステップである。高感度、ハイスループット、低コストの実現が必須である。これまででは、CeIIと呼ばれるミスマッチ認識酵素を用いたり、キャピラリーシーケンシングによるスクリーニングが行われてきたが、

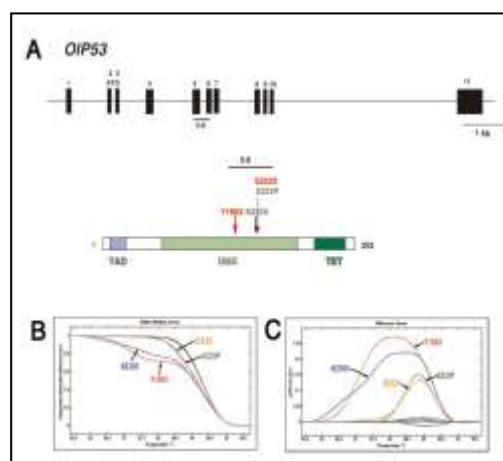
手間がかかり、また極めて高コストであり、多数の変異をスクリーニングするには不向きである。そこで我々は、以下の2つのスクリーニング法を開発する事とした。1) 融解温度曲線分析法：PCR 増幅産物中に存在する変異を、 T_m 値の違いとして、HRM(Hi-Res Melting・融解温度曲線分析)法により検出する変異検出法、2) 次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer(NGS))による大規模スクリーニング。

(2) 組織特異的遺伝子発現系の確立：組織特異的遺伝子発現制御系は、マウスで CRE/loxP を用いた多くの試みがある。しかしながら、CRE の発現部位を正確に限定する事が困難な場合が多くみられる。胚操作が極めて容易であるというメダカの特性を活かし、このマウスの欠点を補おうというのが赤外レーザー照射系である (科学技術振興事業団さきがけ研究(平成10-13年度)「脊椎動物の脳の細胞系譜の解析」研究代表者：弓場、により提案・開発された)。本法では、ヒートショックプロモーターの下流に CRE 遺伝子を組み込んだトランスジェニックメダカの胚組織に赤外レーザーを照射し、CRE の発現を組織特異的に誘導する。CRE 発現により、loxP に挟まれた領域を切り出すことにより、照射部位特異的遺伝子発現のオン・オフを行うといった技法である。組織全体に限らず、各組織内で部分的に遺伝子発現を自由にオン・オフし、その細胞レベルでの影響を、発現制御を行っていない周りの組織部位と比較することができ、極めて詳細な解析が可能になる。

4. 研究成果

TILLING ゲノム DNA ライブラリーのスクリーニング系を確立する事に成功している。TILLING 法において最も重要な点は、ゲノムライブラリー・スクリーニングのハイスループット化及び低コスト化である。いくつかのスクリーニング法を検討し、最終的に高感度融解曲線解析法(High Resolution Melting: HRM 法)が最適であるという結論に達した。HRM 法とは、DNA フラグメントの融解温度を正確に決定する事により、そこに変異(SNP)が含まれているかどうかを判定する手法である。実際には、標的遺伝子のエクソン部位を PCR で増幅し、その PCR 産物に変異が含まれているかどうかのスクリーニングを行う。96穴マイクロプレート上でPCR増幅から解析までが可能で有り、ハイスループット化を実現できた。しかも、6000 個体1エクソン14万円という低コスト化も可能になった(右図に p53 遺伝子のスクリーニング結果を示す。B, C が実際の解析パターンであり、変異を持つ PCR 産物の解析パターンを矢印で示してい

る)。



本法により、本基盤研究(S)で当初予定していた遺伝子に関してはその変異体をほぼ同定できた。しかしながら、国内外におけるメダカ変異体利用の希望は多く、更なるハイスループット化を目指し、次世代シーケンサーによるスクリーニング法の改良を行った。これまでに得られた変異を positive コントロールとして、パイロット実験を行ったところ、ゲノム DNA ライブラリーをある程度混ぜても充分スクリーニング可能であることが判明した。そこで、基礎研究から応用研究まで幅広い分野で解析・利用が期待される重要遺伝子 150 個を選別し、500 エキソンについて次世代シーケンサーによる「大量サンプルの塩基配列決定」と本研究で樹立した「HRM 法」を併用する事により、スクリーニングを行った。シーケンシングサンプルとしては、標的遺伝子エクソンを PCR で増幅したサンプル、標的遺伝子エクソンを合成 RNA ベイト (Agilent 社で合成) で濃縮したサンプルの 2 つについて行った。未だ全ての解析が終了しているわけではないが、いずれのサンプルからも、ナンセンス変異体が現出できている。組織特異的遺伝子発現系については、赤外レーザー照射系がメダカにおいて上手く機能する事を確認した。またこれに加え、トランスポゾンベクターを用いた遺伝子導入法も確立した。piggyBac トランスポゾンは、極めて効率よく染色体ゲノムに外来遺伝子を導入できる事が、哺乳動物等多くの生物で報告されている。我々は、メダカ胚にインジェクションする事により体細胞ゲノムへ外来遺伝子挿入を高効率に誘導できる事を確認した。赤外レーザー照射系との併用により、極めて詳細な体細胞 ectopic 遺伝子発現制御系を樹立する事ができた。本基盤研究(S)で確立した逆遺伝学的手法の成果は、メダカをモデル実験動物として使用する全ての研究者にとり極めて有用である。

そこで我々は、国内外の研究者との共同研究を行い、変異体の作成を行った。以下に共同研究者のリストと、現在までにえら得ているナンセンス変異体のリストを示す（本基盤 S の為に藤堂研で作成したもののみをリストアップし、共同研究先の遺伝子については未発表のため掲載していない）。

共同研究先

Y. Wittbrodt, D. Inoue (ドイツ・Heidelberg 大学)、T. Obara (米国・Oklahoma 大学 Health Science Center)、W. Kuhne, WS. Dynan (米国・Medical College of Georgia)、三谷啓志・尾田正二 (東京大学・大学院新領域創成科学研究科)、弓場俊輔、川崎隆史、出口友則 ((独)産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部)、高浜洋介 (徳島大学・疾患ゲノムセンター)、工藤 明 (東京工業大学・大学院生命理工学研究科)、酒巻和弘 (京都大学・大学院医学研究科)、森 和俊 (京都大学・大学院理学研究科)、木下政人 (京都大学・大学院農学研究科)、北野 健 (熊本大学・理学部)、相沢慎一・黒川大輔 (理化学研究所・発生・再生科学総合研究センター・東京大学・大学院理学系研究科附属三崎臨海実験所)、長濱嘉孝 (基礎生物学研究所・生殖生物学研究部門)、松田 勝 (宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター)、三ツ井貴夫 ((独)国立病院機構・徳島病院)、三輪正直・清水信義 (長浜バイオ大学)、仁科博史・平山順 (東京医科歯科大・難治疾患研究所)、瀬原淳子・佐藤文規 (京都大学・再生医学研究所)、大久保範聡 (東京大学・農学生命科学研究科)、高橋良輔・上村紀仁 (京都大学・医学研究科)、七田芳則・山下高広 (京都大学・理学研究科)

得られたナンセンス変異体

ATM, ATR, DNA-PKcs, p53, Retinoblastoma, Rev1, Msh2, Exo1, Bloom, P-Cryptochrome, Ogg1 等 (他に共同研究として 18 遺伝子)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 12 件)

- ① Masuyama H, Yamada M, Kamei Y, Fujiwara-Ishikawa T, Todo T, Nagahama Y, Matsuda M. Dmrt1 mutation causes a male-to-female sex reversal after the sex determination by Dmy in the medaka. *Chromosome Res.* 2011, 20(1):163-76 (査読有) 10.1007/s10577-011-9264-x
- ② Nakajima H, Ozaki K, Hongyo T, Narama I, Todo T. A rapid and easy method for the qualitative detection of

intracellular deposition of inhaled nanoparticles. *Nanomedicine.* 2011 7; 881-888,. (査読有) 10.1016/j.nano.2011.02.004

- ③ Ishikawa T, Kamei Y, Otozai S, Kim J, Sato A, Kuwahara Y, Tanaka M, Deguchi T, Inohara H, Tsujimura T, Todo T. High-resolution melting curve analysis for rapid detection of mutations in a Medaka TILLING library *BMC Mol Biol.* 2010 15;11(1):70 (査読有) 10.1186/1471-2199-11-70
- ④ Oda S, Mikami S, Urushihara Y, Murata Y, Kamei Y, Deguchi T, Kitano T, Fujimori KE, Yuba S, Todo T, Mitani H. Identification of a functional medaka heat shock promoter and characterization of its ability to induce exogenous gene expression in medaka in vitro and in vivo. *Zoolog Sci.* 2010 ;27(5):410-5. (査読有) <http://dx.doi.org/10.2108/zsj.27.410>
- ⑤ Coesel S, Mangogna M, Ishikawa T, Heijde M, Rogato A, Finazzi G, Todo T, Bowler C, Falciatore A. Diatom PtCPF1 is a new cryptochrome/photolyase family member with DNA repair and transcription regulation activity. *EMBO Rep.* 2009 ;10(6):655-61 (査読有) 10.1038/embor.2009.59
- ⑥ Deguchi T, Itoh M, Urawa H, Matsumoto T, Nakayama S, Kawasaki T, Kitano T, Oda S, Mitani H, Takahashi T, Todo T, Sato J, Okada K, Hatta K, Yuba S, Kamei J. Infrared laser-mediated local gene induction in medaka, zebrafish and Arabidopsis thaliana. *Dev Growth Differ.* 2009, 51(9), 769-75. (査読有) 10.1111/j.1440-169X.2009.01135.x
- ⑦ Hirayama J, Miyamura N, Uchida Y, Asaoka Y, Honda R, Sawanobori K, Todo T, Yamamoto T, Sassone-Corsi P, Nishina H. Common light signaling pathways controlling DNA repair and circadian clock entrainment in zebrafish. *Cell Cycle.* 2009;8(17):2794-801. (査読有) <http://dx.doi.org/10.4161/cc.8.17.9447>
- ⑧ Hitomi K, DiTacchio L, Arvai AS, Yamamoto J, Kim ST, Todo T, Tainer JA, Iwai S, Panda S, Getzoff ED. Functional motifs in the (6-4) photolyase crystal structure make a comparative framework for DNA repair photolyases and clock cryptochromes.

Proc Natl Acad Sci U S A.

2009 ;106(17):6962-7 (査読有)

10.1073/pnas.0809180106

- ⑨ Kamei Y, Suzuki M, Watanabe K, Fujimori K, Kawasaki T, Deguchi T, Yoneda Y, Todo T, Takagi S, Funatsu T, Yuba S. Infrared laser-mediated gene induction in targeted single cells in vivo. *Nature Methods*. 2009 ;6(1):79-81. (査読有)
10.1038/nmeth.1278
- ⑩ Tomida J, Masuda Y, Hiroaki H, Ishikawa T, Song I, Tsurimoto T, Tateishi S, Shiomi T, Kamei Y, Kim J, Kamiya K, Vaziri C, Ohmori H, Todo T. DNA damage-induced ubiquitylation of RFC2 subunit of replication factor C complex. *J Biol Chem*. (2008) 283(14):9071-9. (査読有)
10.1074/jbc.M709835200
- ⑪ Kamei Y, Itou J, Oda S, Masui M, Kim JH, Ishikawa T, Yuba S, Kinoshita M, Mitani H, Todo T. Development of a convenient in vitro fertilization method using interspecific hybrids between *Oryzias latipes* and *Oryzias curvnotus*. *Dev Growth Differ*. (2007) 49(9):721-30. (査読有)
0.1111/j.1440-169X.2007.00966.x
- ⑫ Ikehata H., Ono T., Tanaka K., Todo T. A model for triplet mutation formation based on error-prone translational DNA synthesis opposite UV photolesions. *DNA Repair* (Amst). 2007 6(5):658-68. (査読有)
<http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2006.12.011>

[学会発表] (計5件)

- ① Tomoko Fujiwara-Ishikawa, Takeshi Todo et al. Isolation and characterization of p53, ATM and ATR mutants in medaka fish. 14th International Congress of Radiation Research, 2011.08.30, Warszawa, Poland
- ② Tomoko Fujiwara-Ishikawa, Takeshi Todo. High throughput screening of induced mutations in Medaka TILLING library. 5th Asia and Oceania Conference for Photobiology, 2011.07.31, 奈良県奈良市
- ③ 石川 智子, 亀井保博, 藤堂 剛, メダカATM, ATR変異体の解析、日本放射線影響学会第52回大会、2009年11月12日、広島国際会議場
- ④ Todo T. Establishment of Reverse Genetics in Medaka, The Fourth Aquati

c Animal Models of Human Disease conference, February 1, 2008, Durham, North Carolina USA

- ⑤ Todo T. Screening of induced point mutations in Medaka with TILLING, 13th International congress of Radiation Research, July10, 2007, San Francisco USA

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤堂 剛 (TODO TAKESHI)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90163948

(2) 研究分担者

三谷啓志 (MITANI HIROSHI)

東京大学・新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：70181922

弓場俊輔 (YUBA SHUNNSUKE)

独立行政法人・産業技術総合研究所・研究員

研究者番号：40263248

(平成19年8月30日から、平成21年3月31日まで辞退、平成21年4月から再参加)

川崎隆史 (KAWASAKI TAKASHI)

独立行政法人・産業技術総合研究所・研究員

研究者番号：60356839

(平成19年8月30日から平成21年3月31日まで弓場俊輔に代わり参加)