

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24241018

研究課題名(和文)メダカを用いた体細胞遺伝学：体組織レベルでの損傷応答機構解析系の確立

研究課題名(英文)Establishment of Molecular Genetic Method for Damage-response at Tissue Cell

## 研究代表者

藤堂 剛 (Todo, Takeshi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：90163948

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,300,000円

研究成果の概要(和文)：DNA損傷応答研究における今後の重要課題は、細胞レベルで明らかにされてきた損傷応答機構が、実際の個体内(体組織レベル)でどのように制御され、発がん等生体影響抑制につながっているのかを明らかにする事である。本研究ではメダカにおいてDNA損傷応答を体組織レベルで解析する系の樹立を目指した。損傷応答に関わる遺伝子のメダカ変異体を基盤に、Transgenic(TG)個体あるいはトランスポゾンベクターにより体細胞モザイクを作成し、遺伝子機能解析を行うのが基本戦略である。容易にゲノムDNA領域をクローニングでき、しかもメダカゲノムへの挿入を高効率に行なえるベクター系の樹立に成功した。

研究成果の概要(英文)：The most important issue for the study of damage-response is an establishment of method for direct analysis of somatic tissue cell. In this study, we have tried to establish novel molecular-genetic method using medaka as experimental model animal. The strategy we have employed is transgenesis-mediated mosaicism by use of efficient gene transfer vector. piggyback (PB) transposon can integrate into genome DNA efficiently when injected into fertilized eggs. We have produced PB-based BAC transfer vector which can transfer large genomic DNA region. Using the PB vector, we have succeeded to establish germ cell transformant and somatic mosaic.

研究分野：分子放射線生物学

キーワード：損傷応答 メダカ

### 1. 研究開始当初の背景

放射線や化学変異原による DNA 損傷に対する細胞応答の研究は、関与する遺伝子群の同定・機能解析、それらのクロストークによるネットワークの解明等めざましい展開をみせている。これらの研究の多くは培養細胞を用いた系で解析されている。培養細胞は極めて均質な細胞集団であり、詳細な解析が可能である。一方、生体組織は、組織内で生涯にわたりゆっくりと分裂を繰り返し細胞を供給する「組織幹細胞」、それを取り巻くニッチ構造、それから派生する分化にコミットした増殖細胞、さらには分化した機能細胞等、様々なタイプの細胞により構築されている。この様な複雑な生体組織の解析には、組織内の個別細胞を *in situ* に解析する新たな方法論の導入が必要である。

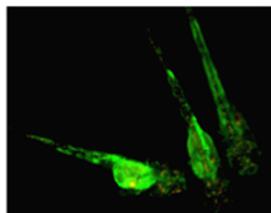
### 2. 研究の目的

本申請研究では、体細胞モザイクの作製による組織レベルでの遺伝子機能解析系を提案する。変異細胞と正常細胞がモザイクとなった体組織を作製し、いずれかの細胞を蛍光色素でマーキングしておき *in situ* に表現型を観察するのが基本的戦略である。そこで、モザイク作成のための基本システムを構築するとともに、そのシステムの既に作製している損傷応答変異体を用いたモデル系への適用を行なった。

### 3. 研究の方法

1) 体細胞モザイクの作成：変異体を基盤に BAC (Bacterial Artificial Chromosome) を用いた「正常ゲノム DNA-TG 個体」を作製し、変異体の表現型 rescue を観察するのが基本方法である。この時、「BAC rescue された細胞」と「されていない変異細胞」が混在する体細胞モザイクを作製する事により、組織レベルでの詳細な遺伝子機能の解析を行う。体細胞モザイクを用いた解析は、古くから発生・分化研究において組織内細胞の役割同定に威力を発揮してきた。モザイク作製には放射線による体細胞 crossing over が用いられてきたが、本申請ではトランスポゾンベクター-piggyBac (PB ベクター) を用いた高頻度遺伝子導入により試みる。PB ベクターがメダカにおいて極めて効率よくゲノム DNA への挿入

を起こす事は本研究で確認している(右図参照)。当該遺伝子領域を含む BAC ゲノム DNA を PB ベクターに挟んだコンス



GFPマーカーPBベクターを導入した体細胞変異個体

トラクトをメダカ受精卵にインジェクションする事により、高頻度に形質転換した体組織モザイクを作製する。一方、損傷応答関連遺伝子ヌル変異体は劣性致死となる場合が多く観られる。この場合には、上記方法に、以下の Cre/loxP 系を利用した工夫を行なった。遺伝子機能に影響を与えない部位に loxP を挿入した正常ゲノム BAC で rescue した個体を樹立した後、一部の体細胞で Cre を発現させ BAC 上の遺伝子を再度ノックアウトするという方法である。例えヌル変異体が劣性致死となる場合にも対応できる。

3) 変異体の利用：既に p53, ATM, ATR, Rb, Exo1, Rev1, Msh2, Ogg1 等の損傷応答に関与する遺伝子のナンセンス変異体を作成している。更に網羅的な変異体作製が現在進行中であり、これ等ライン化された変異体を利用する。

4) PB ベクターへの BAC ゲノム領域の挿入：p53, ATM, ATR のゲノム領域を含む BAC を購入し、ベクター作成を行った。ATM, ATR に関しては、基生研のメダカバイオリソースプロジェクト NBRP から購入した。P53 に関しては、メダカ p53 遺伝子の上流にメダカゲノムプロジェクトでまだ確定していない領域が含まれていたため、ゼブラフィッシュ p53 領域を含む BAC クローンを Children's Hospital Oakland Research Institute より購入した。

### 4. 研究成果

1) PB ベクターの構築：基本となる PB ベクター及び PB トランスポゼース遺伝子は Sanger Institute から譲渡いただいた。基本ベクターは PB トランスポゾン両端の繰り返し配列を含んでおり、この両端繰り返し配列の間に以下の配列を持たせ、モザイク作成ベクターとした。

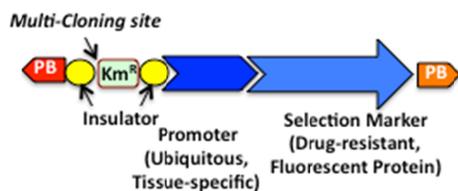
インシュレーター：PB はランダムにゲノム内に入り込む為、自らの発現制御領域からの制御に加え、挿入場所周辺の遺伝子発現制御を同時に受ける可能性がある。挿入場所からの遺伝子発現制御の影響をできるだけ排除する為に、インシュレーターを用いた。

薬剤選択マーカー：基本的には、当該遺伝子の上流遺伝子末端から下流遺伝子末端までのゲノム領域を PB ベクターに挿入する。メダカゲノムはヒト・マウス等の哺乳動物に比べコンパクトである。それでも、上流遺伝子末端から下流遺伝子末端までは通常 20-30kb に達する。構築後の予期せぬ deletion を防ぐ為にカナマイシン耐性遺伝子を選択マーカーとして挿入した。

マルチクローニングサイト：BAC ゲノム領域を PB ベクターに挿入する為に、ユニークな制限酵素サイトを導入した。

選択マーカー：メダカゲノムに挿入された事を確認できるマーカーを挿入した。培養細胞用には TK プロモーターの下流にハイグロ

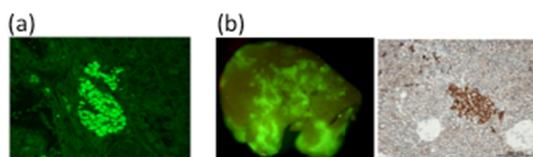
マイシン耐性遺伝子を繋いだコンストラクトとし、形質転換細胞を薬剤で選択できるようにした。一方、個体への遺伝子導入ベクターとしては、アクチンプロモーターの下流に蛍光色素遺伝子 (GFP, K-Orange) を導入した。また、極めて大きな遺伝子には逆に PB 両端繰り返し配列を BAC に挿入する事とした。以下に基本ベクターを示す。



### 基本PBベクター

#### 2) 体組織細胞モザイクの作製:

本研究では、放射線や化学変異原による DNA 損傷応答を体組織レベルで解析する事を最終目標としている。この時、どの体組織を標的に解析を進めるかが重要である。放射線については脾臓を、また化学変異原については肝臓を対象とする事とした。脾臓は極めて放射線感受性が高い組織であり、しかも短時間でアポトシス等の影響が顕われるため、有用な放射線影響検出系となる事が期待される。また、化学発ガンに置いては、変異原により様々な組織でガン誘発が観られるが、多くのアルキル化剤では肝臓ガンが最も一般的に観られるものである。本研究では、マウス等他のモデル実験動物、あるいは過去のメダカを用いた実験結果から、Diethylnitrosoamine (DNA) による肝臓ガンを対象とする事とした。上図にも示したように、高効率に体組織に遺伝子導入ができる事が個体の外観から観察できる。実際に体内組織においても高効率モザイクになっている事を、BAC の p53 領域を含む PB ベクターを用いた体細胞遺伝子導入個体で確認する事ができた (下図参照)。

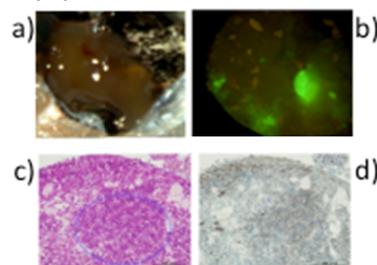


体組織細胞モザイク:  
GFPマーカーPBベクターにより作製  
(a) 脾臓、(b)肝臓

受精卵に PB コンストラクトを導入後、成体にまで成長後モザイク状態を観察しているわけであるが、組織幹細胞に於いて発現が持続している細胞がマーキングされると、それらは体組織内コロニーとして観察できる事が、上図右端の詳細な組織切片図から判る。

DENA はマウスにおける肝臓ガン誘発化学変異原として多くの報告がある。また、メダカにおいて肝臓が誘発の報告がある数少な

い化学変異原である。メダカにおける DENA 誘発肝臓系を樹立した。この系を用い、体細胞モザイク個体に於ける発ガンを観察した。モデルシステムとしては Rev1 遺伝子のヌル変異個体に、PB ベクターを用い野生型、あるいは deoxycytidil-Terminal Transferase 活



体細胞モザイク個体でのDNA誘発肝臓ガン

a) ガンを有する肝臓、b)蛍光顕微鏡像  
c) 組織切片像、d) GFP抗体染色像

性を欠失した Rev1 遺伝子ゲノム領域を導入したモザイク個体を用いた。DNA により誘発された肝臓ガンにおいては、後者遺伝子を持つ細胞がクローン化している事が観察できた。発ガンをエンドポイントに、目的とする遺伝子の各種部位変異の影響を観察する系が樹立できたと考えている。

ただ、問題点としてはマーカー遺伝子発現のプロモーターを今後改良していく事が挙げられる。培養細胞用に用いている TK プロモーターは、Hygromycin によるセレクションが上手く働いている事から問題無いと判断している。しかしながら、個体組織内での GFP マーキングは、免疫染色の結果は肝臓での発現が弱いことがわかった。ここでは、b-アクチン遺伝子プロモーターを用いているが、今後観察する対象組織によっては、他のハウスキーピング遺伝子プロモーターに変更する必要が考えられる。

#### 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23件)

- 1) Uemura N, Koike M, Ansai S, Kinoshita M, Ishikawa-Fujiwara T, Matsui H, Naruse K, Sakamoto N, Uchiyama Y, Todo T, Takeda S, Yamakado H, Takahashi R. Viable neuronopathic Gaucher sisease model in Medaka (*Oryzias latipes*) display axonal accumulation of Aipha-Synuclein. *PLoS Genet.* 2015 Apr 2;11(4):e1005065.doi:10.1371/journal.pgen.1005065. eCollection 2015 Apr.
- 2) Ansai S and Kinoshita M. (2014) Targeted mutagenesis using CRISPR/Cas system in medaka. *Biology Open*, 3, 362-371.
- 3) Ansai S, Inohaya K, Yoshiura Y, Schartl M, Uemura N, Takahashi R, Kinoshita M. (2014) Design, evaluation, and screening methods for

- efficient targeted mutagenesis with TALENs in medaka. *Develop. Growth Differ.*, 56, 98-107.
- 4) Hirano A, Kurabayashi N, Nakagawa T, Shioi G, Todo T, Hirota T, Fukada Y. *In vivo* role of phosphorylation of cryptochrome 2 in the mouse circadian clock. *Mol. Cell. Biol.* 2014, 34(24):4464-73. DOI: 10.1128/MCB.00711-14.
- 5) Murozumi N, Nakashima R, Hirai T, Kamei Y, Ishikawa-Fujiwara T, Todo T, Kitano T. Loss of follicle-stimulating hormone receptor function causes masculinization and suppression of ovarian development in genetically female medaka. *Endocrinology*. 2014 155(8) 3136-45 doi: 10.1210/en.2013-2060.
- 6) Akashi M, Okamoto A, Tsuchiya Y, Todo T, Nishida E, Node K. A Positive Role for PERIOD in Mammalian Circadian Gene Expression. *Cell Rep.* (2014), 7(4) 1056-64 (14)00282-4, doi: 10.1016/j.celrep.2014.03.072.
- 7) Yasui T, Morii E, Yamamoto Y, Yoshii T, Takenaka Y, Nakahara S, Todo T, Inohara H. Human papillomavirus and cystic node metastasis in oropharyngeal cancer and cancer of unknown primary origin. *PLoS One*. 2014 9(4):e95364. doi: 10.1371/journal.pone.0095364. eCollection 2014.
- 8) Akihiro Goriki, Fumiyuki Hatanaka, Jihwan Myung, Jae Kyoung Kim, Takashi Yoritaka, Shintaro Tanoue, Takaya Abe, Hiroshi Kiyonari, Katsumi Fujimoto, Yukio Kato, Takashi Todo, Akio Matsubara, Daniel Forger, Toru Takumi, A Novel Protein, CHRONO, Functions as a Core Component of the Mammalian Circadian Clock. *PLoS Biol.* 2014 12(4):e1001839. doi: 10.1371/journal.pbio.1001839.
- 9) Nakajima H, Fujiwara M, Tanihata I, Saito T, Matsuda N, Todo T. Imaging plant leaves to determine changes in radioactive contamination status in Fukushima, Japan. *Health Phys.* 2014 May;106(5):565-70. doi: 10.1097/HP.0000000000000020.
- 10) Maruyama H, Yasui T, Ishikawa-Fujiwara T, Morii E, Yamamoto Y, Yoshii T, Takenaka Y, Nakahara S, Todo T, Hongyo T, Inohara H. Human papillomavirus and p53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma among Japanese population. *Cancer Sci.* 2014 105(4) 409-417. doi: 10.1111/cas.12369.
- 11) Oliveri P, Fortunato AE, Petrone L, Ishikawa-Fujiwara T, Kobayashi Y, Todo T, Antonova O, Arboleda E, Zantke J, Tessmar-Raible K, Falciatore A. The Cryptochrome/Photolyase Family in aquatic organisms. *Mar Genomics*, 2014, 14 23-37 doi: 10.1016/j.margen.2014.02.001.
- 12) Otozai S, Ishikawa-Fujiwara T, Oda, S, Kamei Y, Ryo H, Sato A, Nomura T, Mitani H, Tsujimura T, Inohara H, and Todo T p53-Dependent Suppression of Genome Instability in Germ Cells. *Mutat Res.* (2014) 760:24-32 doi: 10.1016/j.mrfmmm.2013.12.004
- 13) Bubenshchikova E, Kaftanovskaya E, Adachi T, Hashimoto H, Kinoshita M, Wakamatsu Y. (2013) A protocol for adult somatic cell nuclear transfer in medaka fish (*Oryzias latipes*) with a high rate of viable clone formation. *Cellular Reprogramming*, 15, 520-530.
- 14) Okuyama T, Isoe Y, Hoki M, Suehiro Y, Yamagishi G, Naruse K, Kinoshita M, Kamei Y, Shimizu A, Kubo T, Takeuchi H. (2013) Controlled Cre/loxP Site-Specific Recombination in the Developing Brain in Medaka Fish, *Oryzias latipes*. *PLoS ONE* 8: e66597.
- 15) Shimada A, Kawanishi T, Kaneko T, Yoshihara H, Yano T, Inohara K, Kinoshita M, Kamei Y, Takeda H. (2013) Trunk exoskeleton in teleosts is mesodermal in origin. *Nature Communications*, 4, Article Number 1639, doi: 1038/ncomms2643.
- 16) Kawanishi T, Kaneko T, Moriyama Y, Kinoshita M, Yokoi H, Suzuki T, Shimada A, Takeda H. (2013) Modular development of the teleost trunk along the dorsoventral axis and *zic1/zic4* as selector genes in the dorsal module. *Development*, 140, 1486-1496.
- 17) Ansai S, Sakuma T, Yamamoto T, Ariga H, Uemura N, Takahashi R, Kinoshita M. (2013) Efficient Targeted Mutagenesis in Medaka Using Custom-Designed Transcription Activator-Like Effector Nucleases. *Genetics*, 193, 739-749.
- 18) Kobayashi K, Kamei Y, Kinoshita M, Czerny T, Tanaka M. (2013) A Heat-Inducible cre/loxP Gene Induction System in Medaka, *Genesis*, 51, 59-67.
- 19) Zantke J, Ishikawa-Fujiwara T, Arboleda E, Lohs C, Schipany K, Hallay N, Straw AD, Todo T, Tessmar-Raible K. Circadian and Circalunar Clock Interactions in a Marine Annelid. *Cell Rep.* (2013) 5(1):99-113 doi:pii: S2211-1247(13)00472-5.10.1016/j.celrep.2013.08.031.
- 20) Hashimoto K, Todo T Mitotic slippage underlies the relationship between p53 dysfunction and the induction of large micronuclei by colcemid. *Mutagenesis*. (2013) 28(4) 457-64 doi: 10.1093/mutage/get021
- 21) Kadomatsu T, Urugami S, Akashi M, Tsuchiya Y, Nakajima H, Nakashima Y, Endo M, Miyata K,

Terada K, Todo T, Node K, Oike Y. A molecular clock regulates angiopoietin-like protein 2 expression. *PLoS One*, 2013;8(2):e57921.

doi: 10.1371

22) Ishikawa T, Okada T, Ishikawa-Fujiwara T, Todo T, Kamei Y, Shigenobu S, Tanaka M, Saito TL, Yoshimura J, Morishita S, Toyoda A, Sakaki Y, Taniguchi Y, Takeda S, Mori K.

ATF6a/b-mediated adjustment of ER chaperone levels is essential for development of the Notchord in Medaka fish.

*Mol Biol Cell*. 2013 24(9):1387-1395.

24) Yasuda T, Oda S, Li Z, Kimori Y, Kamei Y, Ishikawa T, Todo T, Mitani H. Gamma-ray irradiation promotes premature meiosis of spontaneously differentiating testis-ova in the testis of p53-deficient medak (*Oryzias latipes*).

*Cell Death Dis*. 2012 Oct 4;3:e395.

doi: 10.1038/cddis.2012.133.

〔学会発表〕(計16件)

1) 藤原(石川) 智子、藤川芳宏、藤堂 剛 CRISPR/Cas9システムによるメダカ光回復酵素遺伝子変異体の樹立 第36回光医学光生物学学会、2014.7.25-26、銀杏会館(大阪)

2) 藤原(石川) 智子、藤川芳宏、藤堂 剛、ゲノム編集技術:CRISPR/Cas9システムによるメダカ光回復酵素遺伝子変異体の樹立 第24回日本光生物学協会年会 2014.8.22-23、大阪市大(大阪)

3) 藤川芳宏、藤原(石川) 智子、佐久間 哲史、山本 卓、藤堂 剛 TALENsを利用した遺伝子破壊によるメダカの損傷乗り越えDNA合成ポリメラーゼ遺伝子変異体の作成 第24回日本光生物学協会年会 2014.8.22-23、大阪市大(大阪)

4) 藤川芳宏、藤原(石川) 智子、佐久間 哲史、山本 卓、藤堂 剛TALENsによるメダカにおける TLS ポリメラーゼ遺伝子群変異体の網羅的作製、第57回日本放射線影響学会、2014.10-1-3、鹿児島文化センター(鹿児島)

5) 藤原(石川) 智子、藤川芳宏、藤堂 剛、CRISPR/Cas9システムによるメダカ光回復酵素遺伝子変異体の樹立、第57回日本放射線影響学会、2014.10-1-3、鹿児島文化センター(鹿児島)

6) 藤原(石川) 智子、音在 信治、尾田 正二、三谷 啓志、猪原 秀典、藤堂 剛 メダカ生殖細胞における放射線誘発遺伝的不安定性の解析、第57回日本放射線影響学会、2014.10-1-3、鹿児島文化センター(鹿児島)

7) Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Yoshihiro Fujikawa, Eri Shiraishi, Takeshi Todo Molecular mechanism of mutagenesis in Medaka fish, International Symposium on Genome Science 2015, Expanding Frontiers of Genome Science II

(東京、一橋会館) 2015.1.20-21

8) Yoshihiro Fujikawa, Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Kumi Nakamura, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Takeshi Todo, Genome editing in medaka: targeted inactivation of TLS polymerase genes using TALENs 第19回小型魚類研究 2013.9.20

9) Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Yoshihiro Fujikawa, Kumi Nakamura, Takeshi Todo Genome editing in medaka: targeted inactivation of DNA photolyase family genes using CRISPR system 第19回小型魚類研究 2013.9.20

10) Kumi Nakamura, Yoshihiro Fujikawa, Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Tetsushi Sakuma, Takashi Yamamoto, Takeshi Todo, Genome editing in medaka: targeted inactivation of *Rev1* gene by TALEN 第19回小型魚類研究 2013.9.20

11) 藤原 石川 智子 1)、藤川 芳宏 1)、中村 公美 1)、藤堂 剛 1) ゲノム編集技術(CRISPR)を利用したメダカ光回復酵素遺伝子変異体の作製、日本放射線影響学会第56回大会 2013.10.19 ホテルクラウンパレス青森

12) 藤川 芳宏、藤原(石川) 智子、中村 公美、佐久間 哲史、山本 卓、藤堂 剛 ゲノム編集技術(TALEN)を用いたメダカにおける TLS ポリメラーゼ変異体の網羅的作製 日本放射線影響学会第56回大会 2013.10.19 ホテルクラウンパレス青森

13) 中村 公美、藤原(石川) 智子、佐久間 哲史、山本 卓、藤堂 剛 ゲノム編集技術TALENを用いた特異的欠損部位変異の作製方法の樹立;メダカRev1 BRCT ドメイン欠損変異体作製、日本放射線影響学会第56回大会 2013.10.19 ホテルクラウンパレス青森

14) Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Kumi Nakamura, Yoshihiro Fujikawa, Takeshi Todo Targeted Inactivation of *Rev1* gene The 6<sup>th</sup> Asia and Oceania Conference on Photobiology, 2013.11.11, Sydney

15) Kazunori Zikihara, Kohei Kasakawa, Tomoko Ishikawa, Kristin Tessmar-Raible, Satoru Tokutomi, Takeshi Todo, The molecular structure and damaged-DNA repair activity affected by the chromophore binding states in Cryptochrome-DASH from *Platynereis dumerili* The 6<sup>th</sup> Asia and Oceania Conference on Photobiology, 2013.11.11, Sydney

16) Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Kumi Nakamura, Yoshihiro Fujikawa, Takeshi Todo Targeted Inactivation of DNA photolyase family genes using CRISPR system The 6<sup>th</sup> Asia and Oceania Conference on Photobiology, 2013.11.11, Sydney

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/radbio](http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/radbio/)  
[/www/index.html](http://www/index.html)

## 6．研究組織

### (1)研究代表者

藤堂 剛 (Takeshi Todo)

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

木下政人 (Masato Kinoshita)

京都大学・大学院農学研究科・助教

研究者番号：60263125

### (3)連携研究者

藤原(石川)智子 (Tomoko Ishikawa-Fujiwara)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：70402922