

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18529

研究課題名(和文)メダカ一倍体を用いた小胞体ストレス応答発動因子ATF6輸送開始因子の探索

研究課題名(英文)Screening of transport component of ATF6 by haploid medaka system

研究代表者

石川 時郎(Tokiro, Ishikawa)

京都大学・理学研究科・助教

研究者番号：70632545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞の恒常性を維持する生体防御維持機構である小胞体ストレス応答を司る転写因子 ATF6は小胞体ストレスを感知し、小胞体からゴルジ体へ移行し切断を受けて活性化する。この移行を制御するタンパク質を同定・解析するために、本研究ではメダカ雑種一代目を用いた順遺伝学法を開発することを目的とした。

実験の結果、当初計画していた雑種一代目の産生の効率が想定よりも低かったため、現在この系の改良を進めるとともに、相同組換えを頻発する遺伝子変異を利用したスクリーニング系の立ち上げに取り組んでいる。

研究成果の概要(英文)：ATF6 is a transcription factor that regulates the unfolded protein response. In response to ER stress, ATF6 is transported from the ER to the Golgi apparatus and activated. The transport factor involved in the process has not been identified. To understand activation mechanisms of ATF6, I was trying to identify the transport factor by the new forward genetic screening system using the hybrid medaka embryo. I found that the rate of generation of hybrid embryo is lower than expected. I continued to improve this systems, and started establishing alternative screening system using mutant fish in which hyper recombination occurs.

研究分野：細胞生物学

キーワード：小胞体ストレス応答 小胞体ストレス UPR メダカ ATF6

## 1. 研究開始当初の背景

細胞が様々な環境変化に晒された場合、膜タンパク質や分泌タンパク質を折り畳む場である小胞体に負荷が生じ、小胞体内に折畳みに失敗した構造異常タンパク質が蓄積する小胞体ストレスが生じてしまうことがある。これに対処するための小胞体ストレス応答を制御する転写因子 ATF6 は通常状態では小胞体膜に不活性型として存在し、小胞体ストレスに反応して、ゴルジ体へと移行することでゴルジ体に局在するプロテアーゼ S1P, S2P による連続切断を受けることで転写因子ドメインが膜より遊離し活性化される。これにより、種々の標的遺伝子の転写が活性化され、小胞体ストレスが軽減される。

この ATF6 がゴルジ体へと移行する最初のステップは、ATF6 が小胞体ストレスを感知するステップであり、この分子機構を明らかにすることは小胞体ストレスの分子実体を解明する上で極めて重要である。これまで ATF6 をゴルジ体へと移行する『エスコートタンパク質』が存在することが強く示唆されていることからエスコートタンパク質の同定・解析が ATF6 のゴルジ体移行機構の解明の鍵となる。

エスコートタンパク質を探索する方法は多種に及び、これまで様々な方法が試みられてきたがこれは未だ同定されていない。

近年申請者は、ATF6 の活性に伴い EGFP 蛍光を発する遺伝子改変メダカ PBIIP-EGFP 系統を作出した。この系統を ATF6 ノックアウト系統と掛け合わせると有意に EGFP 蛍光が減少する。

このことから、申請者はこの系統にランダムな変異を導入し、EGFP 蛍光を指標に ATF6 の活性化が減少した個体を探索することで、エスコートタンパク質に変異が導入された系統を作出できるのではないかと考えた。この系統のゲノムを解析することでエスコートタンパク質をコードする遺伝子が同定できると考えられる。

しかし、従来行われてきた変異導入・変異体単離の方法では、表現型を見出すために掛け合わせにより変異を両アレルに持たせる必要がある。つまり、1 匹の G0 魚に含まれる変異を解析するために、これを野生型と掛け合わせ、得られた F1 を複数ペアにして F2 を大量にとることでしか変異を見つけることができない。現在の変異導入効率ではおよそ 6000 匹の G0 メダカを解析する必要があることから、F1, F2 メダカを大量に飼育する必要

があり、この方法ではコストと時間がかかりすぎるため、実現は困難であった。

## 2. 研究の目的

本研究では上述のエスコートタンパク質遺伝子を同定・解析することを最終的な目的とする。そのため次に述べる改良型メダカ順遺伝学法を確立・実施することを目的とした。

## 3. 研究の方法

ATF6 のエスコートタンパク質を同定するため、本研究ではメダカを用いた一倍体スクリーニング系を立ち上げることとした。本系では日本メダカと近縁の海外メダカを掛け合わせて得られた初期胚において一倍体となることを利用する。

この系では 1 匹の解析に 1 卵で表現型が表れるため、6000 匹の解析に 6000 卵のみで十分であり、これは十分に実現可能である。

本系の立ち上げのためには、ATF6 の活性化をモニターするための PBIIP-EGFP 系統および陽性コントロールである ATF6 ノックアウト系統が必要であるがこれは既に樹立済みであった。

これらを用いて一倍体を作製し、EGFP シグナルが減少することが確認できれば、本系の立ち上げに成功したと判断し、ENU を用いた変異導入法により作製した 100 匹の変異導入オスメダカと野生型海外メダカを掛け合わせることで、変異を探索し、得られた個体ゲノムを次世代シーケンサーにより解析することで、変異を同定できる。

## 4. 研究成果

### (1) 異種間メダカ交配によるスクリーニング系の立ち上げ

本系を立ち上げる際に、ATF6 のノックアウトメダカを CRISPR により再度作製した。これまでに使用していたノックアウトメダカは TILLING 法により作成されているため、予期せぬ部分に変異が入っている可能性があったためである。CRISPR によっても非特異的な変異導入は考えられるため、両者をコントロールとして用いることとした。

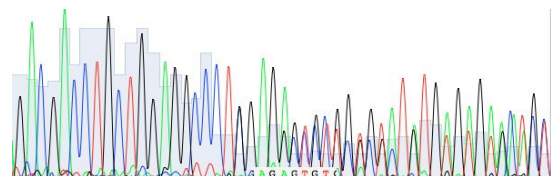


図 1 ATF6 ex2 K0 変異 配列

次に、ATF6 のレポーターである PBiP-EGFP 系統とコントロールである Pbactin-tagCFPmito 系統を掛け合わせ、ATF6+/-: PBiP-EGFP TG/+ : Pbactin-tagCFPmito : TG/+ 系統を作成した。

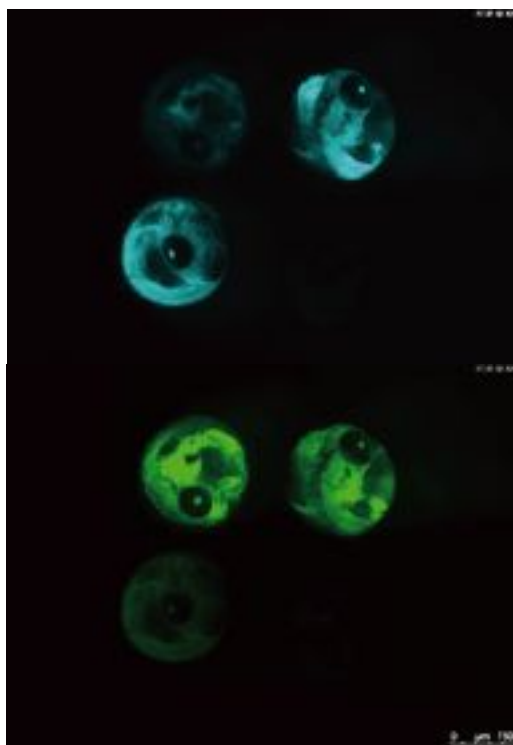


図 2 マーカー遺伝子発現メダカ Pbactin-tagCFPmito 蛍光(上)

PBiP-EGFP 蛍光(下)

この魚を海外メダカと掛け合わせることでスクリーニングが行えるかを検証した。しかし、予想に反し掛け合わせによる採卵が困難であり、大量の卵を得ることができなかった。

本実験で用いた日本メダカは人に慣れやすい Kyoto-Cab 種であり、掛け合わせ、採卵が比較的容易に行える。しかしながら、掛け合わせた海外メダカは警戒心が強いいため、異種間のメダカで気性があわず、掛け合わせが起こりにくかった可能性が考えられる。

現在、稚魚期より両者を同水槽にて飼育することで、互いの気性の違いを長期間に渡り慣らしてゆくことでこの問題の解決を試みている。

(2) 相同組換え頻発異常変異体を用いたスクリーニング系の立ち上げ

上記の通り、当初計画したスクリーニングは想定よりも条件設定に時間がかかることが明らかとなったため、スクリーニングコンセプトはそのままに異なる方法でスクリーニングを行うための実験系を並行して確立することにした。

そこで着目したのが各体細胞で相同組換えが頻発することで、各アレルが高い確率でホモ接合体となるヒト常染色体劣性遺伝病である。この遺伝病では、種々の不調・病態を引き起こす。

この原因遺伝子への変異を導入すると細胞単位で相同組換えが誘発される。魚類ではメダカでノックアウト、ゼブラフィッシュでノックダウンの実験により、同様の現象が確認されているためこれを用いたスクリーニング系を立ち上げることにした。

まず、この遺伝子を Cas9 系によりノックアウトを行い、次にこの遺伝子と相同な遺伝子についてもノックアウトを行った。

現在、両遺伝子を heterozygous に持つ個体の掛け合わせを開始しており、それぞれの単独ノックアウト、両者のダブルノックアウトいずれの条件で一番相同組換えが引き起こされるかを確認する予定である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Tokiro Ishikawa, Takuya Toyama, Yuki Nakamura, Kentaro Tamada, Hitomi Shimizu, Satoshi Ninagawa, Tetsuya Okada, Yasuhiro Kamei, Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Takeshi Todo, Eriko Aoyama, Masaharu Takigawa, Akihiro Harada, Kazutoshi Mori

UPR Transducer BBF2H7 Allows Export of Type II Collagen in a Cargo- and Developmental Stage-Specific Manner

査読有り、Journal of Cell Biology, 216-6, 2017, 1761-1774

DOI: 10.1083/jcb.201609100

Satoshi Ninagawa, Tetsuya Okada, Yoshiki Sumitomo, Satoshi Horimoto, Takehiro Sugimoto, Tokiro Ishikawa, Shunichi Takeda, Takashi Yamamoto, Tadashi Suzuki, Yukiko Kamiya, Koichi Kato and Kazutoshi Mori

EDEM2 initiates mammalian glycoprotein ERAD by catalyzing the first mannose trimming

査読有り、Journal of Cell Biology, 211-4, 2015, 775-784

DOI: 10.1083/jcb/201504109

〔学会発表〕(計 5 件)

石川時郎、岡田徹也、石川(藤原)智子、  
安齋 賢、亀井保博、木下政人、藤堂剛、森和  
俊

Comprehensive analysis of IRE1 mediated  
UPR pathway in Medaka fish

International Meeting on Aquatic Model  
Organisms for Human Disease and  
Toxicology Research

2016年3月18日、岡崎コンファレンスセン  
ター(愛知県)

石川時郎、岡田徹也、石川(藤原)智子、  
安齋 賢、亀井保博、木下政人、藤堂剛、森和  
俊

メダカ発生過程における IRE1 生理的機能の  
包括的解析

第 38 回日本分子生物学会年会・第 88 回日本  
生化学大会 合同大会、2015 年 12 月 4 日、  
神戸ポートアイランド(兵庫県)

石川 時郎, 安齋 賢, 岡田 徹也, 木下 政  
人, 森 和俊

phiC31 インテグレースによる高効率遺伝子  
導入に用いる Landing site(attP) 導入メダ  
カ系統の樹立

第 21 回小型魚類研究会

2015 年 9 月 19 日、大阪大学(大阪府)

石川時郎、岡田徹也、石川(藤原)智子、  
安齋 賢、亀井保博、木下政人、藤堂剛、森和  
俊

メダカ発生過程における IRE1 生理的機能の  
包括的解析

第 21 回小型魚類研究会

2015 年 9 月 19 日、大阪大学(大阪府)

石川時郎、岡田徹也、石川(藤原)智子、  
安齋 賢、亀井保博、木下政人、藤堂剛、森和  
俊

Comprehensive analysis of physiological  
functions of pXBP1(S) producing  
components in medaka fish

FASEB science research conference: From  
Unfolded Proteins in the ER to Disease

2015 年 6 月 15 日、バーモント州(アメリカ)

〔図書〕(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

石川 時郎 (Ishikawa Tokiro)

京都大学大学院 理学研究科 助教

研究者番号 : 70632545