様式Ｃ-19

科学研究費補助金研究成果報告書

平成２１年　３月３１日現在

研究種目：基盤研究（B）
研究期間：2006～2008
課題番号：18310038
研究課題名（和文）　突然変異体メダカ系統を用いた生殖細胞ゲノム維持機構の解析

研究課題名（英文）　Study of Genome Stability of Germ Cells Using Medaka Mutants

研究代表者
三谷　啓志　（MITANI HIROSHI）
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授
研究者番号：70181922

研究成果の概要：放射線高感受性 ric1 細胞は、DNA2 本鎖切断の修復が遅延しており、γ線による断片化を伴う細胞死が起きない。緑色蛍光蛋白質(GFP)遺伝子を生殖細胞特異的に発現する ric1 系統を用いたところ、卵割期にすでに ric1 生殖細胞は、放射線高感受性であり、生殖腺移行後に孵化率に影響を及ぼさない線量に対して大きな性差があることも分かった。また、酸化損傷修復に関わる OGG1 遺伝子の突然変異ホモ接合体メダカを作製した。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2006 年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2007 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2008 年度	3,500,000	1,050,000	4,550,000
年度			
年度			
総　計	15,300,000	4,590,000	19,890,000

研究分野：　複合新領域
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：放射線　動物　遺伝学　ストレス　遺伝子

１．研究開始当初の背景

生物の体を構成する細胞は日々更新されており、古くなった細胞と置き換わるべき新しい細胞が常に供給されなければ生物はその体を維持することすらかなわない。増殖能を有する特別な細胞群が新しい細胞の供給源となっていて幹細胞と呼ばれているが、この幹細胞において生じたDNA損傷が修復されずに放置されると癌化、老化の主原因になるものと考えられている。したがって、生命の存続には、ＤＮＡに生じた傷を監視し、見つけしだい復元するＤＮＡ修復機構が不可欠である。このような理由から、体細胞においては幹細胞におけるＤＮＡ損傷を迅速に修復する必要があるし、また、生殖細胞におけるＤＮＡ損傷は、次世代に異常を遺伝させないために、やはり厳密に修復されなくてはならない。このＤＮＡ修復機構とＤＮＡ複製、遺伝子組換え、遺伝子転写、アポトーシス等の分子機構は、生命の長い進化の過程で複雑なネットワークを形成し、近年その複雑な分子ネットワークの全体像が徐々に明らかにされつつある。
生殖細胞と種々の体細胞幹細胞において、それぞれにおいて生じたＤＮＡ損傷の修復の緊急度は異なる。したがって、それぞれにおいてＤＮＡ修復機構をはじめとするこれらの機構は異なった制御を受けていることは容易に想像できるが、それらがどのように生殖細胞、体細胞において最適化され、それぞれにおいてＤＮＡ損傷を機能的に修復し、最終的にゲノムの安定性を保証しているかに

ついての研究はいまだ未着手である。特に、生殖細胞はその増殖と分化が生涯を通じて劇的に変化し、さらに減数分裂という特殊な環境変化にも曝される点で、そのゲノムの維持機構そのものがダイナミックに制御されていると予想されているが、その実態もまったく不明である。
ERATO 近藤誘導分化プロジェクト、京都大学放射線研究センターとの共同研究により、メダカ ENU 突然変異系統作製技術を用いて野生系統では影響を及ぼさない低線量のガンマ線照射によっても発生異常を示す放射線高感受性メダカ突然変異系統を３系統樹立した。これらの系統の初期胚細胞を分離し、コメットアッセイ法によってガンマ線により誘発される DNA 二重鎖切断の再結合能を検討したところ、RIC1 系統胚では、野生型に比べて低い二重鎖切断再結合能を示した。また、予備的実験により低線量ガンマ線照射によって精巣の幹細胞が特に障害を受け易く、細胞死を生じるのに対して、RIC2、RIC3 の両系統では小腸がもっとも障害の顕著な臓器であった。これらの結果は、RIC1 では生殖幹細胞に、RIC2、RIC3 では体細胞幹細胞における DNA 修復機構に機能不全があるものと考えられ、３系統を統合活用することによって生殖細胞、体細胞の DNA 修復機構の差異、相互作用について細胞・個体レベルで解明することができると期待され研究を開始した。

２．研究の目的
ゲノム維持機構に障害を有するこれらメダカ突然変異体を統合的に活用し、発生障害、生殖細胞突然変異、発癌等の放射線生物作用機構へのこれら遺伝子の関与機構を培養細胞レベルから組織・個体レベルにかけて解明することを目的とする。特に、メダカでは癌化しない状態で細胞を株化することが可能であることから、培養細胞レベルでの解析結果をそのまま組織・個体のレベルに演繹することが可能であると期待される。さらに、トランスジェニックメダカ作成技術を統合させることによって重複突然変異体、遺伝子導入による細胞死過程の個体・組織レベルでの可視化を実現し、もって生殖細胞系列におけるゲノム維持機構を、細胞・個体・組織レベルを通して体細胞のそれと比較し、そのダイナミクスを統合的に解明することを目的とする。さらに新たな酸化ストレスに関連するゲノム維持遺伝子の突然変異体のスクリーニングを行う。

３．研究の方法
(1)突然変異体の組織特異的放射線感受性の比較
大規模 ENU 突然変異体スクリーニングで胚期の放射線誘発形態形成以上を指標として得られた系統の成魚組織での放射線感受性を比較する。

(2)放射線突然変異体 ric1 系統より培養細胞株を樹立して、DNA 修復、細胞死と細胞周期調節を野性型株由来培養細胞と比較する。

(3) 生殖細胞特異的に発現する vasa 遺伝子の発現調節領域を用いて、緑色蛍光蛋白質(GFP)遺伝子を生殖細胞特異的に発現する ric1 系統を新たに作製し、生殖細胞の放射線応答を野性型と比較する。

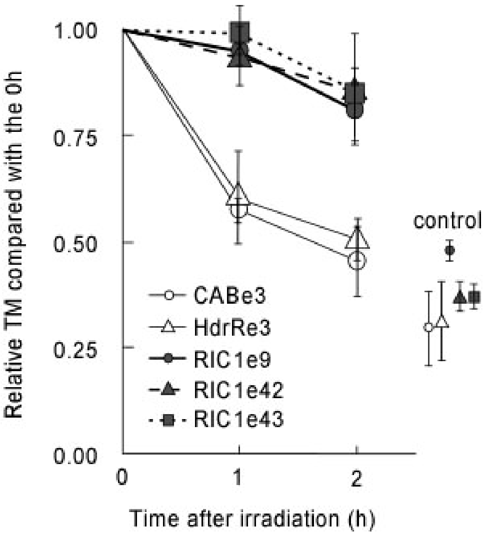
(4) OGG1 遺伝子は、DNA 鎖のシトシンに対合している 8-oxoG を除去する DNA グリコシラーゼをコードする。この遺伝子の突然変異体は、発がんや老化に変異が起こることが期待される。Tilling Library より、Light Scanner を用いて変異を有する個体を同定して、ホモ接合個体を作製する。

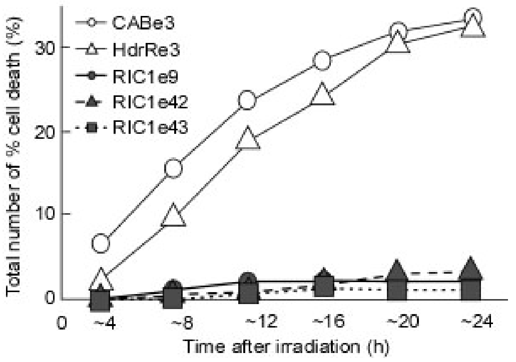
４．研究成果

(1) CAB 系統・RIC1 変異体・RIC2 変異体に対し 20Gy のγ線を照射し、照射 30 日後までの生存率を調べたところ、CAB 系統と RIC1 変異体では 90%以上の個体が 30 日後まで生存していたのに対し、RIC2 変異体は 40%の個体しか生存できなかった。RIC1 変異体は高線量を当てても生存していく上ではあまり影響がなく、RIC2 変異体では CAB 系統や RIC1 変異体では死に至らない線量で、体細胞に大きな影響が表れて死んでしまうことが示された。20Gy 照射 10 日後における各臓器への影響を、大きさを指標として半定量的に調べたところ、CAB 系統と RIC1 変異体では腸の長さ、脾臓・肝臓・胆嚢の大きさに照射前後で大きな変化は見られなかった。これに対し、RIC2 変異体のみ 20Gy 照射 10 日後に腸が非常に短くなり、胆嚢の肥大が観察され、脾臓も照射後に小さくなっていた。照射 5, 10 日後の腸組織は、CAB 系統と RIC1 変異体ともに腸上皮細胞の核が肥大し球形になっていたが、30 日後にはほぼ非照射時の状態に戻っていた。
RIC2 変異体では 20Gy 照射 10 日後に腸のひだ（絨毛）が非常に小さくなり腸上皮細胞の核が肥大し球形になっており、消化不能と見られる組織像が観察された。
2.5Gy のγ線照射では、CAB 系統と RIC2 変異体では照射 5 日後, 10 日後と精巣は徐々に萎縮したが、30 日後には精巣の大きさに回復傾向が見られた。これに対し RIC1 変異体では、CAB 系統に高線量（25Gy）のγ線を照射した場合と同様に、2.5Gy のγ線照射により精巣は回復不能なほど小さくなっていた。
RIC1 変異体において 2.5Gy 照射 5 日後で精原

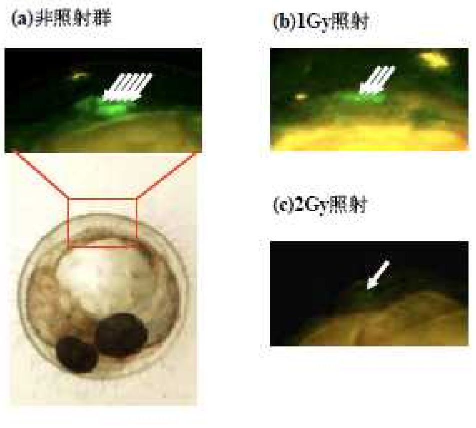
幹細胞がほとんど消滅していたのは細胞死によるものなのか、いつ消滅するのかを調べるために、CAB系統・RIC1変異体に2.5Gyのγ線を照射し、24時間後・3日後における細胞死の検出を行った。その結果、照射24時間後におけるCAB系統の精巣では精原幹細胞の細胞死が多く検出された。これに対し、RIC1変異体では照射24時間後には細胞死はほとんど検出されず、野性型では細胞死の認めらない照射3日後に多くの細胞死が検出された。

(2)コメットアッセイ法によってDSBの修復を解析した結果、RIC1 細胞（RIC1e9、RIC1e42、RIC1e43）全てに DSB 修復の欠損が見られ、その程度を表す TM 値は、IR 処理 2 時間後に野生型細胞（CABe3、Hd-rRe3）では照射直後の約 50%に達したのに対して、RIC1 細胞では照射直後の約 80%にとどまった。
細胞の形態を顕微鏡法によって time-lapse 撮影することにより細胞死を解析した結果、野生型はIR処理後24時間以内に約30%の細胞がアポトーシス小体を形成する細胞死を起こした。それに対し、RIC1は約10%以下の細胞しか形態変化を起こさず、また、アポトーシス小体を形成した細胞はほとんど見られなかった。細胞分裂を time-lapse 撮影することにより解析した結果、野生型、RIC1 共に IR 処理直後に細胞分裂の停止が見られた。野生型は IR 処理後 12 時間から 24 時間にかけて徐々に分裂する細胞が見られたのに対し、RIC1 は 8 時間後から急激に分裂する細胞が見られた。RIC1 細胞を用いた解析の結果、RIC1 細胞は DNA 修復、アポトーシス、細胞周期チェックポイント全てに異常が見られたが、野生型細胞と RIC1 細胞の間では、DNA 損傷の初期応答である H2AX のリン酸化は、生じていた。





(3) 生殖細胞で発現するメダカ vasa 遺伝子の制御領域に GFP 遺伝子を連結させることによって作製されたトランスジェニックメダカ(olvas -GFP 系統)(Tanaka et al,2001)に、RIC1 変異体を交配し ric1olvas -GFP 系統を作製した。発生段階７にγ線(1Gy,2Gy)を照射した。
照射 4 日後の胚において形態的に正常発生している胚の生殖細胞量を定量したところ、ric1olvas -GFP 系統の胚には、1Gy および 2Gy のγ線照射後の生殖細胞量に大幅な減少が観察された。このとき生殖細胞の放射線感受性に雌雄の差はなかった。生殖細胞第２分裂開始期にあたる発生段階 33 における生殖細胞の放射線感受性に ric1 遺伝子が関与しているのかを検討するために、両系統の胚に孵化率に影響を及ぼさない線量を照射し、照射後の生殖細胞量を定量した。その結果、両系統において線量に応じて生殖細胞量の減少が見られた。雌雄別にγ線照射後の生殖細胞量の変化率を算出したところ、ric1olvas -GFP 系統では雌の方が雄よりも変化率の変動が大きく、放射線感受性が高いことが示唆された。これは発生段階 33 において性分化が起こっており、雌生殖細胞の方が雄生殖細胞よりも分裂頻度が高いためであると考えられる。



(4) 雄個体を化学突然変異原(ENU)で処理し、生殖細胞に変異を導入し、健康な雌とかけ合わせた F1 雄個体を多数樹立し、それらの精子とゲノム DNA をセットで保存しライブラリー化した。このライブラリーのゲノム DNA を基質に、PCR により増幅し、変異を検出する。そのための融解温度曲線解析には、これまで極めて高感度で、しかも詳細な解析が可能なソフトが整備されている。Idaho Tech. 社製の Light Scanner を用いた。8-oxoG を除去する DNA グリコシラーゼをコードする遺伝子 OGG1 遺伝子のエクソン１に変異のある個体を同定し、それ由来の凍結精子を起こし、現在ホモ接合である稚魚を得ることができ、8-oxoG の定量を進めている。

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　８件）
①Goodale, B.C., R. Walter, S.R. Pelsue, W.D. Thompson, S.S. Wise, R.N. Winn, H. Mitani, and J.P. Wise, Sr. (2008) The cytotoxicity and genotoxicity of hexavalent chromium in medaka (*Oryzias latipes*) cells. Aquat Toxicol 87: 60-67.

②Hirayama, M., M.N. Ahsan, H. Mitani, and S. Watabe. (2008) CYR61 is a novel gene associated with temperature-dependent changes in fish metabolism as revealed by cDNA microarray analysis on a medaka *Oryzias latipes* cell line. J Cell Biochem 104: 1297-1310.

③Tomida J, Y.Masuda, H.Hiroaki, T.Ishikawa, I.Song , T.Tsurimoto, S.Tateishi, T. Shiomi, Y. Kamei, J. Kim, K. Kamiya, C. Vaziri, H. Ohmori, and T. Todo (2008) DNA damage-induced ubiquitylation of RFC2 subunit of replication factor C complex.J Biol Chem. 283:9071-9079.

④Kamei Y, J.Itou, S. Oda, M. Masui, J.H.Kim, T. Ishikawa, S. Yuba, M. Kinoshita, H.Mitani, and T. Todo (2007) Development of a convenient in vitro fertilization method using interspecific hybrids between *Oryzias latipes* and *Oryzias curvinotus*. Dev Growth Differ. 49:721-730.

⑤Aizawa,K., Yori,K., Kaminaga,C., Yamashita,T., Kinoshita,M., Oda,S., Mitani,H. (2007) Responses of embryonic germ cells of the radiation-sensitive Medaka mutant to γ-irradiation. J. Radat. Res. 48, 121-128.

⑥Taniguchi, Y., Takeda, S., Furutani-Seiki, M., Kamei, Y., Todo, T., Sasado, T., Deguchi, T., Kondoh, H., Mudde, J., Yamazoe, M., Hidaka, M., Mitani, H., Toyoda, A., Sakaki, Y., Plasterk, R. H., Cuppen, E. (2006) Generation of medaka gene knockout models by target-selected mutagenesis. Genome Biol., 7, R112.

⑦Kim, I. C., Lee, Y. M., Lee, C., Kim, H. M., Oda, S., Lee, Y. S., Mitani, H., and Lee, J. S. (2006) Expression profiles of 4-nonylphenol-exposed medaka (*Oryzias latipes*) analyzed with a 3.4K microarray. Mar Environ Res., 62 Suppl 1, S141-146.

⑧Sasaki, T., Shimizu, A., Ishikawa, S. K.,Imai, S.,Asakawa, S.,Murayama,Y., Khorasani, M. Z., Mitani, H., Furutani-Seiki, M., Kondoh, H., Nanda, I., Schmid, M., Schartl, M., Nonaka, M., Takeda, H.,Hori, H., Himmelbauer, H., Shima, A. and Shimizu, N. (2006) The DNA sequence of medaka chromosome LG22. Genomics, 89, 124-133

〔学会発表〕（計　７件）
① Mitani H., Hidaka M., Yori K., Yamashita T., Nishino K., Urushihara U., Oda S.: Study of Genome Surveillance Mechanisms in Fish using Radiation Sensitive Medaka Mutant with Defective Repair of DNA Double-Strand Breaks. The 4th International Aquatic Animal Models of Human Disease Conference (AAMHD), Duke University, Durham NC Jan 31st-Feb 3rd, 2008

② 日高征幸、尾田正二、漆原佑介、桑原義和、福本学、三谷啓志: DNA 損傷応答遺伝子 ric1 の機能解析. 日本放射線影響学会第 51 回、北九州、2008 年 11 月

③ 漆原 佑介, 尾田 正二, 野田 朝男, 小林 純也, 小松 賢志, 三谷 啓志：メダカを用いた DNA 二本鎖切断修復可視化日本放射線影響学会第 51 回、北九州、2008 年 11 月

④ Mitani H., Aizawa K., Yori K., Kaminaga C., Yashita T., Nishino K., Hidaka M., Kinoshita M., Oda S.:Highly radiosensitive germ cells in Medaka ric1

mutant with abnormal DNA double-strand break repair and apoptosis induction. 13th International Congress of Radiation Research, San Francisco, July 2007.

⑤ Hidaka M., Oda S., Kuwahara Y., Fukumoto M., Mitani H.: The mutation of ric1 induces delayed repair of DNA double strand breaks, cell death inhibition and early checkpoint release. 13th International Congress of Radiation Research, San Francisco, July 2007.

⑥Mitani H.: High radiosensitivity and abnormal apoptosis in germ cells of medaka ric1 mutant. SETAC (North America) 27th Annual Meeting, Montréal, November 2006

⑦日高征幸、尾田正二、三谷啓志: DNA 修復、細胞周期、細胞死の制御における ric1 遺伝子の関与. 日本放射線影響学会第 49 回大会、北海道、2006 年 9 月

〔図書〕(計１件)
① Mitani,H., Kamei,Y., Fukamachi,S., Oda,S., Sasaki,T., Asakawa,S., Todo,T., Shimizu,N.(2006) The Medaka Genome: Why we need the multiple fish models in vertebrate functional genomics. Genome Dynamics vol2. "Structure and Evolution of Vertebrate Genomes" Edited by Volff JN. Karger Publishers Basel p.165-182.

６．研究組織
(1)研究代表
三谷　啓志 (MITANI HIROSHI)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授
研究者番号：70181922

(2)研究分担者
尾田 正二 (ODA SHOJI)
東京大学・大学院新領域創成科学研究科・講師
研究者番号：50266714

石川 智子 (ISHIKAWA TOMOKO)
大阪大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：70402922

(3)連携研究者　なし