

研究種目：若手研究 (A)  
 研究期間：2006-2008  
 課題番号：18681007  
 研究課題名 (和文) 突然変異生成と抑制機構の分子遺伝学的解析：メダカを用いた個体レベル解析系の確立  
 研究課題名 (英文) Establishment of High Resolution Melting Assay for Screening Medaka TILLING Library

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

## 研究成果の概要：

ヒトを含め地球上全ての生物は、紫外線、放射線、化学物質等の外的要因、またエネルギー産生に伴い自らが作り出す活性酸素等の内的要因による DNA 損傷の脅威に常にさらされている。これら脅威の最終的な生物作用は、我々の身体を構成する各細胞の遺伝子への突然変異誘発である。本研究では、メダカをモデル実験生物として用い、突然変異生成機構を明らかにし、これらの脅威へのより良い対処法を見いだす事を目指している。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2007年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
2008年度	5,800,000	1,740,000	7,540,000
年度			
年度			
総計	19,500,000	5,850,000	25,350,000

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：放射線作用機構

## 1. 研究開始当初の背景

放射線や化学物質など環境因子の生物影響を考える上で、突然変異は重要な位置を占める。分子生物学的解析の進展により、突然変異生成のメカニズム、またそれに関わる遺伝子群について、細胞レベルでその詳細が明らかにされてきている。しかしながら、突然変異は極めてまれな事象であるため、個体レベルでの解析、つまり実際の体組織・体細胞の中でどの様な頻度でそれらが生成され、またどの様なタイプの細胞

で起こった変異が発がん等個体レベルでの重篤な帰結につながるのか、についての解析は未だほとんどなされていない。本研究は、「突然変異」の個体・組織レベルでの解析系をメダカにおいて確立することを目指している。マウスは個体レベルでの解析が可能で代表的モデル生物である。哺乳類でありヒトに極めて近く、遺伝子ノックアウトの手法が確立しているなど実験モデル生物として数多くの利点を持っている。しかしながら、受精卵の発生は全て胎内で進む

ため胚操作が極めて限られており、また多数の個体を扱うにはかなりの手間と費用を要するため、多重変異体を用いた解析は実際上不可能である等の欠点がある。そこで、これらマウスの欠点を相補できるような実験モデル生物としてメダカを選んだ。メダカは安価で容易に多数個体を飼育できる。更に、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。特に後者は重要で、胚操作をとおして組織特異的に遺伝子発現を制御することが可能となる。本研究ではメダカをモデル生物に、遺伝子変異体を自由に作成する方法の確立し、「突然変異」の個体レベルでの解析系の確立を目指す。

## 2. 研究の目的

近年数多くの実験モデル生物が開発されてきた。それらの多くは、遺伝学をフルに活用できるという利点を有している。メダカは、我が国で開発された実験モデル生物であり、遺伝学的知識の蓄積が豊富である。更に近年ゲノム情報の整備が進み、マウス、ショウジョウバエに匹敵する近代モデル生物として変身を遂げている。一方、ゲノム生物学時代の到来は、遺伝子の単離を容易にし、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 (Reverse Genetics) 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。我々は、TILLING 法を用い、標的とする遺伝子の変異体を自由に作成する技術の確立しようとしている。TILLING 法とは、Targeted Induced Local Lesions IN Genome の略であり、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 (*Arabidopsis*) やゼブラフィッシュでその有用性が報告されている。TILLING 法は、今後様々な実験生物に適用されていくと考えられる。本研究では、メダカにおける TILLING 法の確立を目指すと同時に、この技法を用い、「突然変異生成に本質的な役割を果たす」遺伝子の変異体を得る事を目的としている。

突然変異は、その生成過程から 1) 損傷誘発突然変異と 2) 自然突然変異とに大別される。環境因子の多くは DNA に損傷を与える。細胞はこれら DNA 損傷を認識し、細胞周期の停止、損傷の修復あるいはアポト

ーシス等様々な応答を誘導することにより、損傷の軽減を計る。しかしながら、最終的に損傷が残存すると、それらが突然変異につながる。通常の DNA 複製酵素はこの様な損傷部位では複製反応を止めてしまう。しかし、多くの生物は、損傷が存在してもそのまま複製反応を行える特殊な DNA 複製酵素 (TLS (Trans Lesional Synthesis) DNA 複製酵素) を持っており、損傷部位で通常の DNA 複製酵素に入れ替わって、この TLS DNA 複製酵素が働く。TLS DNA 複製酵素は、間違っただ塩基を導入し易いため、損傷部位で高頻度に突然変異が導入される。この様に、突然変異は、DNA 修復、細胞周期チェックポイント、アポトーシス、TLS-DNA 複製酵素が損傷部位に於いて極めて有機的に働いた末の最終産物であり、損傷応答の全課程が集約されているといっても過言ではない。従って、「突然変異生成過程から、その生物学的影響」までを解析するには、損傷認識に始まるこれら損傷応答全過程による制御を考慮する必要がある。一方、自然突然変異は多くの場合、DNA 複製過程における間違っただ塩基取込みに起因する。それらの間違いは、通常ミスマッチ修復機構により修復されるが、修復できなかったものが自然突然変異として残る。従って、自然突然変異の解析にはミスマッチ修復機構の制御機構の解明が重要となる。損傷誘発突然変異に関しては、鍵となる TLS DNA 複製酵素としてメダカ Rev1 の変異体を既に得ている。そこで本研究では、自然突然変異生成に関わるミスマッチ修復酵素の変異体の検索を目指した。

## 3. 研究の方法

本研究計画の根幹をなす TILLING 法について以下に概略をのべる。P 雄個体を化学突然変異原 (ENU) で処理し、健康な雌とかけ合わせ、F1 を得る。この 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する。このライブラリーのゲノム DNA を基質に、標的とする遺伝子のエキソンを PCR により増幅し、変異を検出する。変異が同定できれば、セットで保存している凍結精子を起こし、*in vitro* 受精により変異個体を得る、というのが一連のプロトコルである。申請者が所属する研究室では既に、約 6000 個体からなるライブラリーを作成している。また、パイロット実験により実際にどれくらいの頻度で変異が導入されているかを確認したところ、約 350kb に 1 個の割合で変異が導入されており、充分スクリーニングに利用できるライブラリーであることを確認している。TILLING 法でのスクリーニングにおいては、ハイスループット化が要求される。

つまり、大量のサンプルをできるだけ短時間に解析する技法の確立である。一方、メダカを利用する利点の一つは他の哺乳モデル実験動物に比べコストパフォーマンスが極めて良い点である。従って、ハイスループット化に加え、スクリーニングコストの低減化が必須となる。この2点を満たす方法として、本研究ではHRM法 (High Resolution Melting: 融解温度曲線法) によるスクリーニングの有用性の検証を行った。

#### 4. 研究成果

DNA 二重鎖の熱安定性はその塩基配列に依存しており、DNA 溶液の温度を上げて行った場合、各塩基配列に依存した融解曲線を示す。もし、DNA 二重鎖に変異した塩基が含まれ、ヘテロ二重鎖となっている場合は、熱安定性に影響が現れ、ホモ二重鎖と異なる融解曲線を示すようになる。正確な温度融解曲線を決める事により、一塩基置換を含むヘテロ二重鎖を検出するというのが、融解温度曲線法の原理である。融解温度曲線法は、PCR 反応から最終解析までの全てのステップが96穴のマイクロタイタープレートで行う事ができ、極めてハイスループットでしかも低コストな方法である。そこで本研究では、融解温度曲線法が TILLING 法に有効な方法であるかどうかを検証しようとした。他の方法 (TGCE 法) で同一ライブラリーから既に変異体が得られている Rev1 遺伝子の変異体 DNA を用い、融解温度曲線法の確立を行った (図1)。

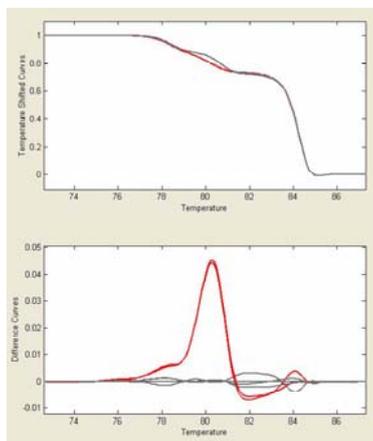


図1 融解温度曲線法による変異検出の一例。灰色曲線が野生型、赤色曲線が変異導入によるヘテロ二量体の融解温度曲線を示している。

融解温度曲線法の基本手法が確立できたので、次にその検出効率の検討を行った。本 TILLING ライブラリーを用いたシーケンシング法による p53 遺伝子の変異体スクリーニングが既に完了している。そこで融解温度

曲線法により同遺伝子のスクリーニングを行い、シーケンシング法との比較を行った。下表に示すように、融解温度曲線法によりシーケンシング法と同等の効率で変異が検出できる事が判明した。

Sequence context	Amino acid change	
	SEQ	HRM
5'-TGGCCAGTA (T>A) TTTGAAGACC-3'	Y186X	Y186X
5'-CTACATGTGT (A>G) ACAGCTCGTG-3'	N220D	
5'-TACATGTGTA (A>G) CAGCTCGTGC-3'	N220S	N220S
5'-GTGTAACAGC (T>C) CGTGCATGGG-3'	S222P	S222P
5'-GTGTAACAGCT (C>A) GTGCATGGG-3'		S222X

表1. シーケンシング法と HRM 法の比較 (p53 遺伝子) TILLING ライブラリーをスクリーニングした結果、p53 のエキソン 5, 6 に総計 5 つの突然変異体が検出され、シーケンシング法でも融解温度曲線解析法でもそのうちの 4 つを検出することができた。

融解温度曲線法によるスクリーニング法を確立できたので、標的遺伝子として自然突然変異誘発に重要な役割を果たすミスマッチ修復遺伝子 *Msh2* の変異スクリーニングを行った。3つのアンプリコン (4エキソン) をスクリーニングする事により1つのナンセンス変異と7つのミスセンス変異を同定できた。(図2)

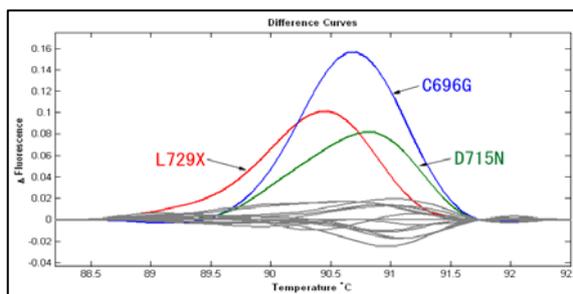


図2. HRM法により検出された *Msh2* ナンセンス変異体の融解温度曲線。赤色曲線がナンセンス変異体の青色曲線、緑色曲線は同一アンプリコンに検出されたミスセンス変異体を示す。

本研究で確立した融解温度曲線法による TILLING ライブラリーのスクリーニングは、96穴マイクロタイタープレートによるスクリーニングを行える事から、極めてハイスループットである。更に、1サンプル25円という低価格化を実現できた。1エキソンが約16万円でスクリーニングでき、ノックアウトマウス作製等と比べても極めて低価格であり、小型魚を利用するメリットをさらに増大させる事に成功した。今後は本法により、突然変異生成機構の解明が進展する事が期待できると同時に、本法に

よる遺伝子変異体スクリーニングを行う事により、生物学のあらゆる分野でのメダカを用いた研究に貢献できると考えている。

#### 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 5 件)

- ① 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. (査読有) 2009 Jun;10(6):655-61
- ② Zikihara K, Ishikawa T, Todo T, Tokutomi S. Involvement of electron transfer in the photoreaction of zebrafish Cryptochrome- DASH. ; Photochem Photobiol. (査読有) 2008 Jul-Aug;84(4):1016-23
- ③ 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. (査読有) 2008 Apr 4;283(14):9071-9.
- ④ 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 curvinotus*. ; Dev Growth Differ. (査読有) 2007 Dec;49(9):721-30.
- ⑤ T. Abe, T. Ishikawa, T. Masuda, K. Mizusawa, T. Tsukamoto, H. Mitani, T. Yanagisawa, T. Todo, M. Iigo : Molecular analysis of Dec1 and Dec2 in the peripheral circadian clock of zebrafish photosensitive cells ; Biochem Biophys Res Commun (査読有) 2006 Dec 29;351(4):1072-7

[学会発表] (計 14 件)

- ① 石川 智子、亀井 保博、音在 信治、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
- ② 谷口 善仁、武田 俊一、石川 智子、亀井 保博、音在 信治、藤堂 剛、TILLING 法による遺伝子破壊メダカ作製の現状第 80 回日本動物学会 2009 年 9 月 18 日静岡県コンベンションアーツセンターグランシップ
- ③ 石川 智子、亀井 保博、音在 信治、藤堂 剛、メダカ逆遺伝学的手法による変異個体を

用いた突然変異生成の分子遺伝学的解析、第 15 回小型魚類研究会 2009 年 9 月 12 日名古屋大学野依記念学術交流会館

- ④ Sacha Coesel、Manuela Mangogna、石川 智子、Marc Heijde、Alessandra Rogato、Giovanni Finazzi、藤堂 剛、Chris Bowler、Angela Falciatore、多機能性新規クリプトクローム/光回復酵素ファミリーメンバー、日本光生物学協会第 15 回大会、2009 年 8 月 19 日、自然科学研究機構岡崎コンフェレンスセンター
- ⑤ 石川 智子、亀井 保博、音在 信治、藤堂 剛、メダカにおける逆遺伝学的手法の確立：突然変異生成機構の分子遺伝学的解析を目指して、変異機構研究会第 22 回夏の学校 2009 年 6 月 21 日愛知県小牧勤労センター
- ⑥ Tomoko Ishikawa, Yasuhiro Kamei, Shinji Otozai, Takeshi Todo, Establishment of Reverse Genetics in Medaka: Isolation and characterization of UV-sensitive mutant. 4<sup>th</sup> Asia Oceania Conference on Photobiology, November 26, 2008 Varanasi, India
- ⑦ 石川 智子、亀井 保博、音在 信治、藤堂 剛、突然変異生成の分子遺伝学的解析、日本放射線影響学会第 51 回大会、2008 年 11 月 20 日 小倉
- ⑧ 石川 智子、亀井 保博、金 鎮炯、音在 信治、藤堂 剛、メダカにおける逆遺伝学的手法を用いた変異体の作製、日本放射線影響学会第 50 回大会 2007 年 11 月 16 日、千葉
- ⑨ 富田 純也、増田 雄司、廣明 秀一、釣本 敏樹、立石 智、石川 智子、亀井 保博、金 鎮炯、大森 治夫、藤堂 剛、DNA 損傷によって誘導される RFC 複合体のユビキチン化、日本放射線影響学会第 50 回大会、2007 年 11 月 14 日、千葉
- ⑩ 石川 智子、亀井 保博、金 鎮炯、音在 信治、藤堂 剛、メダカにおける逆遺伝学的手法の確立：光生物学への応用を目指して、第 14 回光生物協会年会、2007 年 7 月 31 日、奈良
- ⑪ 石川 智子、亀井 保博、金 鎮炯、音在 信治、藤堂 剛、魚類培養細胞における光応答メカニズム、第 14 回光生物協会年会、2007 年 7 月 30 日、奈良
- ⑫ 石川 智子、亀井 保博、桜庭 善行、金 鎮炯、富田 純也、権藤 洋一、藤堂 剛：メダカにおける逆遺伝学的手法の確立：メダカ Rev1 変異体の作製。第 49 回日本放射線影響学会大会、2006 年 9 月 13 日、札幌市
- ⑬ 富田 純也、石川 智子、金 鎮炯、亀井 保博、上田 龍、藤堂 剛：ショウジョウバエ DNA polymerase  $\gamma$  ファミリーの相互作用。第 49 回日本放射線影響学会大会、2006 年 9 月 13 日、札幌市
- ⑭ 亀井 保博、石川 智子、金 鎮炯、藤堂 剛：

Medaka TILLING。第 12 回小型魚類研究会、  
2006 年 9 月、三島市

〔図書〕(計 1 件)

Medaka Biology, Management, and  
Experimental Protocols, pp345-350,  
Editors:Masato Kinoshita, Kenji Murata,  
Kiyoshi Naruse, Minoru Tanaka; WILEY  
-BLACHWELL (2009)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

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