

研究種目：基盤研究（S）
研究期間：2007～2011
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）Screening for point mutations in medaka with TILLING

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

研究代表者の専門分野：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、突然変異生成

1. 研究計画の概要

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」を指標に解析する研究を目指している。

2. 研究の進捗状況

一昨年度、昨年度において TILLING 法によるメダカ逆遺伝学的手法を確立し、ATM, ATR, Rb, p53, Rev1, Exo1, Msh2 の変異体を同定した。これらの変異体について、野生株とバッククロスする事により想定外の導入変異を除去するとともに、ホモ個体を樹立し、変異体の表現型解析を行っている。いずれの遺伝子変異体においても、ヒト・マウスの変異体と類似した表現型を確認している。これら変異体スクリーニングと並行して、組織特異的遺伝子発現系の確立を試みている。基本となる赤外線レーザー顕微照射による遺伝子発現誘導法確立については本年度報告したが、この技術をメダカに適用する為にメダカヒートショックプロモーターの単離・解析、及び Ert-Cre のメダカへの適用を試みている。本法で最終的に目指しているのは、体細胞での遺伝子発現制御による組織特異的遺伝子機能の解析である。このような研究においてメダカを用いる最大の利点は、受精卵への遺伝子導入が哺乳動物に比べ格段に容易で、かつ様々な操作が可能な点である。受精卵への遺伝子導入による体細胞解析をより効率よく、しかも正確性を持

って行なう為に、トランスポゾン piggyBac ベクターのメダカへの適用を試みている。上記逆遺伝学的手法で得られた変異体をベースに、組織特異的遺伝子発現系構築の為に技術的基盤の確立が現実のものとなりつつある。

3. 現在までの達成度

研究の進捗状況でも述べたように、本研究計画の基盤となる①逆遺伝学的手法、②組織特異的遺伝子発現系の2手法については既に確立できており、ほぼ当初の計画通りに進んでいる。

4. 今後の研究の推進方策

本研究の最終目標の一つは、マウス等の哺乳動物を用いた実験系を補完できるモデル動物実験系を樹立する事である。本研究では、モデル動物としての利点を多く兼ね備えたメダカに注目し、小型魚の特徴を活かしたユニークな実験系の構築を目指している。モデル生物としての整備には、1) マウス等の他モデル生物で頻用されている手法が当該モデル生物においても利用できる事、2) 当該モデル生物特有のユニークな手法が利用できる事、の2つが必須条件となる。これまでに確立してきた①逆遺伝学的手法は前者の、また②組織特異的遺伝子発現系は後者の実験手法である。今後更に、1)、2) 両者について、更なる技術開発が必要であると考えている。それらの中で、特に注目したいのはトランスポゾンベクターの利用である。小型魚の特徴の一つは、卵生である為、受精卵への遺伝子導入が容易に、効率よく行える点である。トランスポゾンベクターの利用は極めて高率に遺伝子導入する事を可能にし、小型魚の利点を更に有効利用する強力な手段となる。つまり、Transgenic Line を作製する事無く、遺伝子導入したその個体の体細胞で解析を行う事により、詳

細なキメラ解析が可能となるわけである。本研究では、損傷応答を、突然変異生成に着目して、組織レベルで、単一細胞において解析する事を目指しているが、本技法により飛躍的進展が期待できると考えている。

5. 代表的な研究成果

(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3件)

- ① Doi M, Takahashi Y, Komatsu R, Yamazaki F, Yamada H, Haraguchi S, Emoto N, Okuno Y, Tsujimoto G, Kanematsu A, Ogawa O, Todo T, Tsutsui K, van der Horst GT, Okamura H., Salt-sensitive hypertension in circadian clock-deficient Cry-null mice involves dysregulated adrenal Hsd3b6, Nature Medicine, 16, 67-74, 2009, 査読有り
- ② 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 Y., Infrared laser-mediated local gene induction in medaka, zebrafish and Arabidopsis thaliana. Dev. Growth Differ. 51, 769-775, 2009, 査読有り
- ③ 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, 6, 79-81, 2009, 査読有り

[学会発表] (計2件)

- ① 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
- ② 谷口善仁、武田俊一、石川智子, 藤堂 剛、亀井 保博、音在 信治、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

[その他]

ホームページ

<http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/radbio/www/index-jp.html>