

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：14401  
 研究種目：基盤研究（B）  
 研究期間：2010 ～2012  
 課題番号：22310035  
 研究課題名（和文） 組織構築による細胞微小環境と放射線感受性：メダカを用いた分子遺伝学的解析  
 研究課題名（英文） Molecular genetics of cell niche and radiation sensitivity in tissue construction of *Oryzias latipes*.  
 研究代表者 藤原 智子（石川 智子）(FUJIWARA 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（和文）：癌幹細胞および組織幹細胞の放射線感受性・耐性は様々な要因により制御されている。それらの要因の中でも特に「細胞系譜」と「細胞微小環境」による制御は重要であり、しかもその制御の一端を DNA 損傷チェックポイントが担っていることがこれまでに示唆されている。そこで我々は、組織幹細胞において、ゲノム損傷シグナルと「微小環境」からの増殖シグナルのクロストークを解析する系の確立を目指し、本研究において、「細胞微小環境」形成において重要な役割を果たす Wnt シグナル受容体遺伝子 *Frizzled* 及び DNA 損傷応答制御因子 (*DNA-PKcs*) の変異体の作出を行い、ナンセンス変異体を樹立することに成功した。

研究成果の概要（英文）：To develop the system to study DNA damage response in tissue stem cell, in this study we have established several mutants in two different pathways in Medaka. One is the signal transduction pathway, responsibility to DNA damage. ATM, ATR and DNA-PKcs are member of PI3 kinase family. These gene products play an important role on the initial step of damage response. We have already established ATM and ATR mutants. In this study we have identified DNA-PKcs mutant. We have also obtained p53 mutant, which also play essential role on damage response. Our goal is to analyze the damage response in Medaka using these mutants carrying a single or a multiple mutation. Another is the signaling pathway which regulates cell growth in tissue. The Wnt signaling pathways are a group of signal transduction pathways, which leads to regulation of transcription and cell growth. These signaling pathways are activated by the binding of a Wnt ligand to a Frizzled family receptor. To establish system to regulate cell growth, we have established Frizzled mutants. Establishment of these mutants enables us to study the cross-talk between damage response and growth signaling.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2011 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2012 年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	10,600,000	3,180,000	13,780,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・放射線・化学物質影響化学

キーワード：細胞微小環境、組織幹細胞、メダカ、放射線、組織特異的発現、細胞周期チェックポイント増殖抑制、損傷応答

## 1. 研究開始当初の背景

幹細胞は、多能性幹細胞、組織幹細胞、癌幹細胞に分類できる。iPS 細胞の発見は、これら幹細胞間、あるいは体細胞との間でその細胞特性が変換 (Shuttling) する事を示している (Takahashi, Yamanaka, Cell, 2003)。各々の幹細胞の定義は概念的であるが、実質的な共通性が存在する事を意味している。幹細胞研究に関して当該分野で特に衝撃的であったのは、グリオブラストーマ癌幹細胞の放射線抵抗性を示した報告である (Bao et al. Nature, 2006)。放射線は、ヒト悪性腫瘍の一つであるグリオブラストーマの最も効果的な治療法であるにもかかわらず、放射線耐性の細胞が残存するため緩和療法にしかならない欠点が知られていた。原因として癌幹細胞では ATM, ATR を介した DNA 損傷チェックポイントが選択的に活性化されており、これが癌幹細胞の示す抵抗性の理由である事が示された。一方、組織幹細胞の放射線感受性に関しては、小腸陰窩底部に存在する幹細胞が、がん幹細胞とは異なりきわめて放射線感受性であるが、幹細胞から分裂した増殖性前駆体細胞は放射線抵抗性であることが Potten 等により報告されている (Potten, Radiat Res. 2004)。これらの結果は、癌幹細胞および組織幹細胞は、一律に放射線感受性・抵抗性とは定義できないが、その放射線感受性が「細胞系譜」と「細胞微小環境」により厳密な制御を受けている事、しかもその制御の一端を ATM, ATR を介した DNA 損傷チェックポイントが担っている可能性を示している。一方、「細胞微小環境」形成において重要な役割を果たすものとして Wnt シグナルが知られている。Wnt シグナルは胎生期には形態形成や分化に作用するが、成熟細胞では細胞増殖を制御する。小腸陰窩底部に存在する幹細胞では、間質細胞からの Wnt シグナルにより、その増殖と分化が厳密に制御されている。興味深い事に、乳癌幹細胞では Wnt シグナルによる放射線感受性の制御が報告されている (Woodward et al. PNAS, 104, 2007)。これらの結果は、Wnt シグナルが、放射線感受性を左右する「細胞微小環境」シグナルの有力候補である事を示している。そこで我々は、組織幹細胞において、ゲノム損傷シグナルと「微小環境」からの増殖シグナルのクロストークを解析する系の確立を目指す事とした。

## 2. 研究の目的

ゲノム DNA に損傷が生じた時、細胞はそれを認識し、細胞周期を一時的に停止させる。損傷修復を確認後、再び細胞周期を回復する事により、ゲノム安定性を維持している。この「細胞周期チェックポイント」機構は、あらゆるタイプのゲノム損傷に対する生物の基

本戦略として幅広く受け入れられている。一方、個体あるいは体組織での損傷応答を解析対象とする時、組織を構成する各細胞は、各々の「細胞系譜」と「微小環境」により固有の増殖制御 (細胞周期制御) を受けており、各細胞の損傷応答はゲノム損傷シグナルと細胞固有の増殖制御シグナルとのクロストークとして理解されなければならない。組織幹細胞は、各組織・臓器への多分化能を持ち、組織全体のホメオスタシス維持に限らず、損傷応答においても重要な役割を果たしている。組織幹細胞において、ゲノム損傷シグナルと「微小環境」からの増殖シグナルのクロストークの解析系の確立を目指す。前者の主要経路として ATM, ATR, DNA-PKcs を、また後者のシグナルとして Wnt 経路を取り上げ、各遺伝子の変異体、あるいは二重変異体での組織レベルでの損傷応答を解析する。

## 3. 研究の方法

本研究では、メダカ小腸幹細胞において解析系の確立を目指した。

- 1) 小腸組織幹細胞系において、組織幹細胞を蛍光色素でマーキングする事により、放射線照射後の組織幹細胞の動態を解析する系を樹立する。
- 2) DNA 損傷応答に中心的役割を果たす遺伝子群として ATM, ATR, p53 の変異体はすでに樹立している。さらに、損傷応答に重要な役割を果たす PI3 kinase の一種である *DNA-PKcs* の変異体の作出も行う。これらの変異体を用い、組織幹細胞の「DNA 損傷チェックポイント」の特性を明らかにする。
- 3) Wnt シグナル受容体遺伝子変異体を作製し、ATM, ATR, p53 変異体との交配により Wnt シグナルと「DNA 損傷チェックポイント」のクロストークの解析を行う。
  - 1) についてはこれまでに幹細胞特異的に発現する遺伝子マーカーとして報告のある、*Musashi* 遺伝子の染色体領域を含む BAC クローンをを用い Recombineering の手法により、*Musashi* 遺伝子と EGFP 等の蛍光色素の Fusion 遺伝子を作製し、メダカトランスジェニック (TG) ラインを樹立する。この TG ラインを DNA 損傷応答に中心的役割を果たす遺伝子群 (ATM, ATR, p53) の変異体と掛け合わせ、マーキングされた幹細胞の放射線照射後の動態を観察する。
  - 2)、3) の損傷応答遺伝子変異体、および Wnt シグナル受容体遺伝子変異体の作製については、当研究室で確立した TILLING (Targeting Induced Local Lesion IN Genome) 法により行う。以下に TILLING 法の概略を説明する。G0 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する。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クソンを 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。Wnt シグナル受容体遺伝子としては *Frizzled* 遺伝子に焦点を当てて行う。*Frizzled* 遺伝子は現時点でデータベース上に 10 種類確認されており、これらを網羅的にスクリーニングする系として、次世代シーケンサー (Next Generation Sequencer; NGS) を用いたスクリーニング系の確立を行う。

#### 4. 研究成果

組織幹細胞をマーキングするためのコンストラクトを作製した。これまでに腸幹細胞マーカーとして報告のある *Musashi* 遺伝子全長を含むメダカ BAC クローンを入手し、その第 2 エクソンに recombineering の手法を用いて Kusabira Orangel (MBL) を導入したコンストラクトを作製した。

また損傷応答遺伝子シグナリング、および微小環境制御系解析のための、変異体の作製は TILLING 法でおこなった。まず、*Frizzled2* 遺伝子の第 2 エクソンの一部を、HRM (High Resolution Melting; 高感度融解曲線解析) 法を用いてスクリーニングを行ったが有意な変異は得られなかった。

そこで、NGS を用いて網羅的に変異体をスクリーニングする系の確立を行った。

最初に、NGS によりどのくらい効率よく変異を検出できるのかテストランを行った。テストランでは、これまでに HRM 法によるスクリーニングで検出された 36 個の変異を、ポジティブコントロールとして使用した。10 サンプル、48 サンプル、96 サンプルを混ぜたもので試験的に NGS 解析を行った。

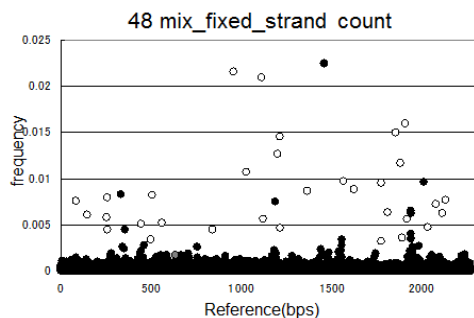


図 1. 48 ミックスの解析結果。横軸はシーケンシングした 26 領域中、ポジコンが含まれる 6 領域の塩基配列、縦軸はそれぞれの配列における塩基の出現頻度を示す。48 サンプルをミックスしているため、変異は 1/96 (こ

のライブラリーの魚はすべてヘテロで変異を含んでいるので) の頻度で出現することが予測される。白丸がポジコン塩基の出現頻度を表す。

その結果、図 1 に示すように、ポジコン塩基が感度、特異度ともに効率よく検出できることが分かった。

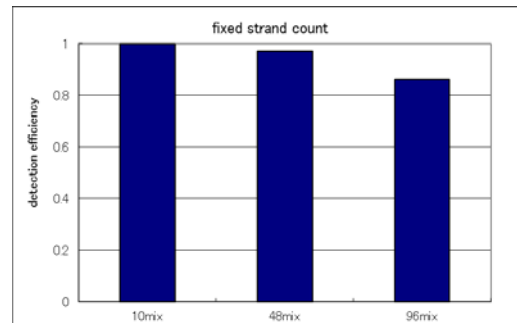


図 2. ポジコンサンプルの検出頻度。各ミックスの検出頻度の上限、下限をそれぞれ 0.01-0.125、0.003-0.025、0.002-0.015 に設定しその中で検出されている塩基の中でポジコン塩基の出現頻度を示す。

48 サンプル混ぜてもサンプル中にポジティブコントロールとして混ぜた変異が 95% 以上の検出効率で検出できた (図 2)。NGS によるスクリーニングが、従来のスクリーニング法と変わらず有用であることが示された。

そこで実際にライブラリーサンプルを 48 サンプルずつ混ぜて *Frizzled* 遺伝子群の変異体スクリーニングを NGS で行った。その結果 *Frizzled3-2* の Y170 および C295、*Frizzled10* の Y328 のナンセンス変異体を得ることができた。一方、損傷応答制御の重要な遺伝子である DNA-PKcs では R3715 のナンセンス変異体を得ることができた。これにより損傷応答に関与する PI3 kinase 変異体すべて揃ったことになる。

以上、本基盤研究 (B) により組織幹細胞における損傷応答解析に必要な変異体を作出することができた。今後、これらの多重変異体を作出し組織レベルでの解析を行いたい。ただ、組織幹細胞のマーキングについては問題が残っている。1) piggy Bac ベクターにより多重挿入個体を作製し感度を上昇させる、2) Lgr 等他のマーカーについても試みる、等の新たな試みを予定している。赤外レーザーによる局所的遺伝子発現誘導法の導入にも成功しており、組織幹細胞マーキングを克服できれば、他生物にないユニークな解析系を樹立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. ATF6  $\alpha/\beta$ -mediated adjustment of ER chaperone levels is essential for development of the notochord in medaka fish.  
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. *Mol Biol Cell*. 2013 May;24(9):1387-1395. Epub 2013 Feb 27. doi: 10.1091/mbc.E12-11-0830
2. Gamma-ray irradiation promotes premature meiosis of spontaneously differentiating testis-ova in the testis of p53-deficient medaka (*Oryzias latipes*).  
Yasuda T, Oda S, Li Z, Kimori Y, Kamei Y, Ishikawa T, Todo T, Mitani H. *Cell Death Dis*. 2012 Oct 4;3:e395. doi: 10.1038/cddis.2012.133.
3. Dmrt1 mutation causes a male-to-female sex reversal after the sex determination by Dmy in the medaka.  
Masuyama H, Yamada M, Kamei Y, Fujiwara-Ishikawa T, Todo T, Nagahama Y, Matsuda M. *Chromosome Res*. 2012 Jan; 20(1):163-76.
4. Characterization of two members of the cryptochrome/photolyase family from *Ostreococcus tauri* provides insights into the origin and evolution of cryptochromes.  
Heijde M, Zabulon G, Corellou F, Ishikawa T, Brazard J, Usman A, Sanchez F, Plaza P, Martin M, Falciatore A, Todo T, Bouget FY, Bowler C. *Plant Cell Environ*. 2010 Oct;33(10):1614-26. doi: 10.1111/j.1365-3040.2010.02168.x
5. High-resolution melting curve analysis for rapid detection of mutations in a Medaka TILLING library.  
Ishikawa T, Kamei Y, Otozai S, Kim J, Sato A, Kuwahara Y, Tanaka M, Deguchi T, Inohara H, Tsujimura T, Todo T. *BMC Mol Biol*. (2010) Sep 15;11:70.

[学会発表] (計 26 件)

1. 人工ヌクレアーゼによるゼブラフィッシュ培養細胞の遺伝子変異細胞の作製  
藤川 芳宏、藤原(石川) 智子、中村 公美、佐久間 哲氏、山本 卓、藤堂 剛  
第 35 回日本分子生物学会年会、福岡、12 月 11 日、2012 年
2. BBF2H7 is required for the correct formation of vertebral bodies and

cartilage in medaka

- Takuya Toyama, Yoshitaka Kagiya, Tokiro Ishikawa, Tetsuya Okada, Tomoko Ishikawa-Fujiwara, Takeshi Todo, Keiji Inohara, Akira Kudo, Kazutoshi Mori  
18th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, Kyoto, 22<sup>nd</sup> September 2012
3. ATF6 plays an essential role in induction of ER chaperones required for notochord formation  
Tokiro Ishikawa, Tetsuya Okada, Tomoko Ishikawa -Fujiwara, Takeshi Todo, Yasuhiro Kamei, Shuji Shigenobu, Minoru Tanaka, Taro L. Saito, Jun Yoshimura, Shinichi Morishita, Atsushi Toyoda, Yoshiyuki Sakaki, Yoshihito Taniguchi, Shunichi Takeda, Kazutoshi Mori  
18th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, Kyoto, 22<sup>nd</sup> September 2012
  4. High throughput screening of induced mutations in Medaka TILLING library by Next Generation Sequencer  
Tomoko Ishikawa-Fujiawara , Takeshi Todo  
18th Japanese Medaka and Zebrafish Meeting, Kyoto, 22<sup>nd</sup> September 2012
  5. 体細胞モザイク作成により体組織レベルでの遺伝子機能解析計確立  
藤堂 剛、藤川 芳宏、藤原(石川) 智子 日本放射線影響学会第 55 回大会、仙台、9 月 8 日、2012 年
  6. メダカ TILLING ライブラリーにおける変異体の網羅的スクリーニング  
藤原(石川) 智子、藤堂 剛  
日本放射線影響学会第 55 回大会、仙台、9 月 7 日、2012 年
  7. 人工ヌクレアーゼを利用した遺伝子改変によるメダカの損傷応答遺伝子変異体の作製  
藤川 芳宏、藤原(石川) 智子、中村 公美、藤堂 剛 日本放射線影響学会第 55 回大会、仙台、9 月 6 日、2012 年
  8. ゴカイ *Platynereis dumerii* 由来 Cryptochrome-DASH における 2 つの発色団の結合特性  
直原 一徳、笠川 弘平、石川 智子、Kristin Tessmar-Raible、徳富 哲、藤堂 剛、第 17 回日本光生物学協会年会、大阪、8 月 18 日、2012 年
  9. Molecular characterization of marine rhythms.  
Tessmar-Raible, K., Zantke, J., Kuegler, P., Oliveri, P., Fortunato, A.E., Falciatore, A., Ribera d'Alcala, M., Buia, M.C., Iacono, B., Zikihara, K., Ishikawa, T. 12<sup>th</sup> HFSP Awadees Meeting Daegu, Republic of Korea, 4, July, 2012

10. Analysis of association between GBA mutation and Parkinson's disease using medaka fish  
Norihiro Uemura, Hideaki Matsui, Tomoko Fujiwara-Ishikawa, Masato Kinoshita, Takeshi Todo, Shun-ichi Takeda, Ryosuke Takahashi, The 1st Strategic Meeting for Medaka Research, 愛知県岡崎市, 2011.11.23
11. ATF6 is essential for induction of ER chaperones required for early development  
Tokiro Ishikawa, Tetsuya Okada, Yoshihito Taniguchi, Tomoko Ishikawa, Takeshi Todo, Shun-ichi Takeda, Kazutoshi Mori, The 1st Strategic Meeting for Medaka Research, 愛知県岡崎市, 2011.11.23
12. High throughput screening of induced mutations in Medaka TILLING library  
Tomoko Fujiwara -Ishikawa, Takeshi Todo  
The 1st Strategic Meeting for Medaka Research, 愛知県岡崎市, 2011.11.23
13. メダカ TILLING ライブラリーの網羅的スクリーニング法の確立  
藤原(石川) 智子、藤堂 剛、日本放射線影響学会第 54 回大会, 兵庫県神戸市, 2011.11.17
14. Comparison of molecular properties between two functionally distinct Cryptochrome-DASH proteins  
Kazunori Zikihara, Reo Fukazawa, Tomoko Ishikawa, Chris Bowler, Takeshi Todo, Satoru Tokutomi, 第 49 回日本生物物理学会年会, 2011.9.16-18
15. A single basepair difference is sufficient to distinguish males from females in medaka fish  
Haruo Masuyama, Masato Yamada, Yasuhiro Kamei, Tomoko Ishikawa, Takeshi Todo, Yoshitaka Nagahama, Masaru Matsuda, 第 17 回小型魚類研究会, 愛知県岡崎市, 2011.09.09
16. Analysis of ERAD mechanism by using transgenic and knockout Medaka  
Taiki Hara, Tokiro Ishikawa, Tetsuya Okada, Tomoko Ishikawa, Takeshi Todo, Kazutoshi Mori, 第 17 回小型魚類研究会, 愛知県岡崎市, 2011.09.08
17. ATF6 is essential for induction of ER chaperones required for early development  
Tokiro Ishikawa, Tetsuya Okada, Yoshihito Taniguchi, Tomoko Ishikawa, Takeshi Todo, Shun-ichi Takeda, Kazutoshi Mori, 第 17 回小型魚類研究会, 愛知県岡崎市, 2011.09.08
18. High throughput screening of induced mutations in Medaka TILLING library  
Tomoko Fujiwara -Ishikawa, Takeshi Todo  
第 17 回小型魚類研究会, 愛知県岡崎市, 2011.09.08
19. Heavy ion radiation effects on spermatogenesis in Medaka (*Oryzias latipes*) p53 nonsense mutant  
Hiroshi Mitani, S. Oda, Z. Li, Y. Kimori, H. Yasuda, T. Fujiwara-Ishikawa, T. Todo, T. Yasuda, 14<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research, Warszawa, Poland, 2011.08.31
20. p53 dependent suppression of Genome Instability in Medaka germ cell  
Takeshi Todo, Tomoko Fujiwara-Ishikawa, Shoji Oda, Hiroshi Mitani, 14<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research, Warszawa, Poland, 2011.08.30
21. Isolation and characterization of p53, ATM and ATR mutants in medaka fish  
Tomoko Fujiwara -Ishikawa, Yasuhiro Kamei, Kim, J.H., Shinji Otozai, Takeshi Todo, 14<sup>th</sup> International Congress of Radiation Research, Warszawa, Poland, 2011.8.30
22. Comparison of molecular properties between two functionally distinct Cryptochrome-DASH proteins  
Kazunori Zikihara, Reo Fukazawa, Tomoko Ishikawa, Chris Bowler, Takeshi Todo, Satoru Tokutomi, 5th Asia and Oceania Conference for Photobiology, 奈良県奈良市, 2011.07.31
23. High throughput screening of induced mutations in Medaka TILLING library  
Tomoko Fujiwara -Ishikawa, Takeshi Todo, 5th Asia and Oceania Conference for Photobiology, 奈良県奈良市, 2011.07.31
24. マイクロサテライトを指標としたメダカにおけるゲノム不安定性の解析, 石川 智子, 音在 信治, 亀井 保博, 尾田 正二, 三谷 啓志, 藤堂 剛, 日本放射線影響学会第53回大会, 京都, 2010.10.21
25. Circular Dichroism measurements in photoreaction of zebrafish Cryptochrome-DASH  
Reo Fukazawa, Kazunori Zikihara, Tomoko Ishikawa, Takeshi Todo, Satoru Tokutomi, 第48回日本生物物理学会年会, 仙台, 2010.9.20-22
26. メダカ ATM, ATR 変異体の解析  
石川 智子, 音在 信治, 亀井 保博, 藤堂 剛, 第16回小型魚類研究会, 埼玉, 2011.09.08

0.9.18

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤原 智子(石川 智子)(Fujiwara Tomoko)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号:70402922

(2) 連携研究者

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